

家兎子宮内精子の動態に関する研究

特に子宮腺腔内への精子侵入現象と
その意義について*

小 山 久 一**

Studies on the Sperm Movement in the Rabbit Uterus, Especially Sperm Penetration into the Uterine Gland and its Significance*

Hisaichi KOYAMA**

(March, 1990)

目 次

第1章 緒 論	72	2. 実験材料および方法	81
第2章 実験材料および方法：各実験に 共通するもの	74	3. 結 果	81
1. 供試家兎	74	1) 生存精子注入後の子宮腺腔内精子	81
2. 家兎の交配および排卵誘起法	74	2) 死滅精子注入後の子宮腺腔内精子	82
3. 組織標本作製法	75	第4節 家兎子宮腺腔内精子に及ぼす 排卵誘起刺激の影響	84
4. 統計処理法	75	1. 目 的	84
第3章 子宮腺腔内精子の観察	75	2. 実験I：hCG またはインドメサシン 投与が子宮腺腔内精子数に 及ぼす影響	85
第1節 ま え が き	75	1) 実験材料および方法	85
第2節 家兎、豚および 牛子宮腺腔内精子の観察	75	2) 結 果	87
1. 目 的	75	3. 実験II：精子注入後、hCG 投与まで の日数が子宮腺腔内精子数に 及ぼす影響	87
2. 実験材料および方法	76	1) 実験材料および方法	87
3. 結 果	76	2) 結 果	87
1) 家兎子宮腺腔内精子	76	第5節 家兎および豚子宮腺の 組織化学的観察	89
2) 豚子宮腺腔内精子	77	1. 目 的	89
3) 牛子宮腺腔内精子	81	2. 実験材料および方法	89
第3節 家兎生存精子および死滅精子の 子宮内注入が子宮腺腔内精子数 に及ぼす影響	81	3. 結 果	90
1. 目 的	81	1) 豚子宮腺における糖質	90

* 本稿は広島大学審査学位論文である。

This is a dissertation presented to the Faculty of Applied Biological Science, Hiroshima University in 1990.

** 酪農学科，家畜繁殖学研究室

Department of Dairy Science (Animal Reproduction) Rakuno Gakuen University, Ebetsu, Hokkaido 069, Japan.

2) 家兎子宮腺における糖質	91
3) 家兎子宮腺における脂質	94
4) 家兎子宮腺における酸性 ホスファターゼ (ACP)	94
第6節 考 察	94
第4章 家兎精子における精漿成分の消長	96
第1節 ま え が き	96
第2節 雌家兎生殖道および子宮腺腔内 精子における精漿成分の消長	97
1. 目 的	97
2. 実験材料および方法	97
3. 結 果	100
1) 雌家兎生殖道における 精漿成分の消長	100
2) 子宮腺腔内精子の螢光反応	100
第3節 交配後、子宮および腔から回収した 精子における精子被覆抗原の消長	100
1. 目 的	100
2. 実験材料および方法	102
3. 結 果	102
第4節 家兎精漿成分における 精子被覆抗原の検討	103
1. 目 的	103
2. 実験材料および方法	103
1) SDS・ゲル電気泳動法による 精漿タンパク質の分離	103
2) 精漿タンパク質の糖質反応	104
3) 精漿分離タンパク質による 家兎精子 SCA の観察	104
4) ゲルクロマトグラフィー法 による家兎精漿成分の分画	106
3. 結 果	106
1) SDS・ゲル電気泳動法による 精漿タンパク質の分離	106
2) 家兎射出精子における分離 精漿タンパク質の分布	107
3) ゲルクロマトグラフィー法による 精漿タンパク質の分離	108
第5節 考 察	109
第5章 交配後の家兎子宮および腔から 回収した精子のヒアルロニダーゼ およびアクロシン活性	110
第1節 ま え が き	110
第2節 実験材料および方法	111
1) ヒアルロン酸フィルム法	111

2) ゼラチンフィルム法	111
3) ゼラチンスライド法	111
4) ヒアルロニダーゼおよび アクロシン活性の観察法	112
第3節 結 果	112
1) ヒアルロニダーゼ活性	112
2) アクロシン活性	113
3) アクロシン活性と精子生存率 および先体の形態	115
第4節 考 察	116
第6章 総 括	117
謝 辞	120
引 用 文 献	120
Summary	128

第1章 緒 論

家畜の雌生殖道内の精子動態に関する生理学的、生化学的研究は多面的に取り組まれ、精子の移動機構、生存、受精能保持、更に受精能獲得など雌生殖道が精子に与える影響について多くの報告がなされている。しかし、雌家兎生殖道内精子の動態には、家畜精子の移動または生理学的変化についての研究の多くが家兎により開始されているにも関わらず、いまだ不明な点が多く存在する。特に、精子貯留または保存部位については十分に解明されているとはいえず、更に検討を要する点が多く残されている。雌生殖道における精子の保存と関連した現象を解明することは、生殖生理学的基礎を確立する上で極めて重要な意義があり、精子の生存時間や受精能保有時間などを明らかにするのにも役立つものである。

雌生殖道内における精子保存部位は各家畜の射精部位によって異なるが、腔内射精動物では頚管の粘膜ヒダ間および陰窩があげられており^{30,125)}、ここに多数の精子が貯留し、長時間生存すると主張されている^{95,96,108)}。また、豚のように子宮腔内に射精する動物では、子宮卵管接合部が精子保存および卵管への精子数を制限する部位として機能していると報告されている¹³³⁾。これに対し、受精に直接関与する精子を卵管膨大部に供給する機能的精子保存部位として、近年、多くの動物において卵管峽部の子宮側部分が注目されるようになってきた^{66~68,71,72)}。すなわち、牛では適正数の精子が貯留しやすいように、排卵前にはこの部位が閉鎖されているが¹⁰⁾、排卵時にここに卵胞ホルモンが局所的に作用して、貯留している生存精子の一部が卵管膨大部方向に放出され、排出直後の卵子と会合するものと考えられてきている⁷⁴⁾。また、緬

羊では精子は交尾後6~8時間で卵管に侵入するが^{68,75)}, 精子は卵管峽部の子宮側1~2 cmの部位に18時間または排卵直前まで停留するといわれている^{70,73)}。同様に豚においても同部位に、36時間以上生存精子が留まっているとの報告がある⁶⁹⁾。

一方、従来より精子に受精能を付与する部位と考えられている子宮には子宮腺が存在するが、この部位に精子保存部位としての機能のあることがいくつかの動物種でいわれてきている。例えば、犬では交配後268時間目においても子宮腔に生存精子が見いだされたとされており、排卵が遅延しても精子は子宮腺腔から卵管へ移動しているものと推察されている³⁶⁾。また、ヨーロッパ野兎では妊娠中にもかかわらず分娩前に交尾を許容し、異期複妊娠を起こすことが報告されている⁹⁴⁾。しかし、この妊娠は最初の交尾による精子が子宮腺腔内で妊娠期間中生存し続け、分娩直前の交尾刺激により排出された卵と受精した結果成立したものと述べられている⁹³⁾。この様に、子宮腺腔は受精可能な精子を長期間保存する部位として、重要な役割を果たしている可能性があるものと考えられるが、観察が困難であるため子宮腺腔内精子の分布を数量的に示した報告は、わずかに猿⁵⁶⁾、野兎⁹³⁾と牛¹⁴⁹⁾に限られている。従って、卵管峽部における精子保存の可能性を明確にするためにも、まず子宮内精子の状態、特に子宮腺との関連において十分に明らかにしておく必要がある。

子宮腺腔内精子は多くの哺乳動物で観察され、前述以外にモルモット⁵⁾、マウス¹⁷⁰⁾、緬羊¹⁴⁸⁾等での報告がある。また、Martinet & Raynaud⁹³⁾は、ヨーロッパ野兎では子宮卵管接合部付近の子宮腺に交配後17日目においても精子の存在するのを見いだしている。犬においては、Griffiths & Amoroso⁵⁴⁾が子宮腺腔の中に多数の精子が充満していたのを観察している。これらのことは、多くの哺乳動物において子宮腺腔が精子保存部位として存在し、精子の生存性および受精能の維持に関与している可能性を強く示している。しかし、家畜において子宮腺腔内の精子生存の意義について追究した報告は全く見当らず、家兎においても腺腔内精子侵入は推測されているものの、それを実証した報告はない。更に、このような子宮腺腔内精子が生存精子の能動的侵入によるものか、あるいは子宮の収縮作用による偶然的なものか全く不明である。

山羊では、交配直後の頸管の陰窩に多数の精子が見いだされるが、Mattner & Braden⁹⁷⁾は、運動性のある生存精子のみが侵入し、死滅精子は頸管粘液と混合、排出されると報告した。このことは腔内射精後、子宮に到達

した精子は自らの運動により子宮腺腔に侵入する可能性のあることを示唆している。しかし、子宮腺腔と精子保存部位との関連を検討するには子宮腺腔内精子が生存精子のみであるか否かを把握しておく必要がある。

一方、子宮内膜の粘膜表面に沿って上向してきた精子が腺腔内に侵入する可能性は十分に考えられる。例えば、反芻家畜では腔内に射精された精子が頸管を通過するとき、腔方へ流出する粘液により上向が抑制され、粘膜に沿って移動する過程で陰窩に侵入すると報告されている⁹⁵⁾。しかし、子宮では子宮腺開口部が非常に狭いので精子侵入は容易ではなく、子宮腺開口部付近に達した精子が分泌液に含まれる物質に対し走性を示すことによって、侵入してくることが充分に考えられる。交配直後から子宮腺を組織化学的に検討した報告は極めて少ないが、Lovell & Getty⁹⁰⁾は豚子宮腺に多糖類の存在することを確認し、また、それらの子宮腺腔内に精子を認めている。豚子宮腺における多糖類の存在と腺腔内精子は、活発な運動性を有する生存精子が子宮腺腔の分泌液に走性を示し、更に分泌液が精子保存には有効に作用している可能性を示唆している。

他方、子宮腺の役割の一つに、精子の保存とは逆に受精に関与しなかった精子の処理機構も考えられている。Austin⁵⁾はモルモットの子宮腺細胞内に精子頭部を見だし、子宮腺のなかで消化されるものと推察した。また、Zamboni¹⁶⁹⁾はマウス子宮腺腔に、しばしば精子を捕捉した白血球の存在することを報告している。一般に、子宮腔内に精液が入るとそれに反応し、多数の白血球が子宮内に浸潤して精子を貪食する像がたびたび観察され、それらが凝集し塊状をなすことが報告されている^{104,105)}。しかし、子宮腺における精子処理機構については不明な点が多く、また交配後経時的に観察した報告は見当らず、種々の疑問が残されている。従って、家兎子宮腺と精子との関係を明らかにすることは、家兎子宮内における精子動態を把握するうえに必要なことと考えられる。

子宮腺腔内精子の数は動物により異なるであろうが、その多くは精子保存または精子処理機構の面からのみ検討され、子宮腺腔内で受けると思われる生理的または機能的変化についてはほとんど知られていない。

このことと関連して、従来強く関心の持たれてきたものの、精子の雌生殖道内における受精能獲得現象がある^{3,21)}。受精能獲得の本態については正確には判明していないが、哺乳動物精子が射精後、雌生殖道内で数時間存在することにより、なんらかの生理学的ならびに機能的変化が起こり、受精を完遂しうる能力を備えるように

なる現象であるといわれている⁴⁰⁾。家兎においては、Chang²²⁾とAdams & Chang²⁾が、精子が子宮および卵管を通過する場合には、約5~6時間で完全に受精能を獲得することを明らかにし、その後Bedford^{7,8)}は子宮内のみでは10~11時間を要すると述べている。Yanagimachi¹⁶⁶⁾は受精能獲得の重要な部分として、精子が精巣上体での成熟過程および精漿と接触することにより精子膜に吸着または結合した物質が*in vivo*または*in vitro*で除去または変化することを指摘している。精漿成分に関しては多くの報告があるが、主なものとして糖タンパク質、ポリペプチドおよびフィブロネクチン様のタンパク質があげられており^{1,65,85,102,112,134)}、射出精子については発情期の雌生殖道内がそれら成分の除去または変化に最も効果があるといわれている^{80,110)}。Johnson & Hunter⁷⁹⁾は精漿タンパク質を抗原とし、家兎精子被覆物質を免疫蛍光抗体法を用いて観察し、子宮内に10時間存在した精子では被覆抗原が除去されることを認めた。また免疫蛍光抗体法を用い雌生殖道における精漿抗原物質の分布についても観察している。これらの報告は、免疫蛍光抗体法を用いた組織化学的観察により、子宮腺腔内精子の受精能獲得現象を追究し得ることを強く示唆している。従って、この方法の適用により子宮腺腔への精子侵入の意義を、受精能獲得との関連で明らかにできるものと考えられる。

この他に、受精能獲得の有無を推定する方法として、精子に塩酸テトラサイクリンを標識して観察する方法が報告されている^{39,41,61,78)}。しかし、標識した家兎精子を卵管または子宮内で培養すると、到底受精能獲得を完成し得ないような短時間の内に蛍光反応が消失すると否定的なVaidya *et al.*¹⁵⁴⁾の報告もあり、この方法により子宮腺腔内での精子の受精能獲得を推定するのは困難であると思われる。また、子宮腺腔内精子の受精能獲得を正確に検定するには、*in vivo* または *in vitro* で卵子と精子を会合させて受精を確認する必要がある。しかし、子宮腺腔内の精子のみを集め、この様な受精試験を行うことは極めて困難であると考えられる。

精子頭部、特に先体部分の精子膜の被覆抗原が消失または変化することは受精能獲得において重要な部分を占めていることは確かなことと推察されるが、被覆抗原と受精能獲得との関連を知るには、その後の先体反応との関連も含めて検討する必要がある。すなわち、精子先体内容物にはヒアルロニダーゼやアクロシン等のライソゾーム様加水分解酵素が含まれている⁹⁸⁾。受精能を獲得した精子は先体反応を発現し、ヒアルロニダーゼを放出して卵丘細胞層の基質を分解し、透明帯に達する。更に、

精子は透明帯をアクロシンで消化し、細胞腔へと入る。このヒアルロニダーゼおよびアクロシンは、射出精子では精漿中の成分により抑制されているが、受精能獲得精子では活性が増加するといわれている^{5,99,119,172)}。従って、精子頭部先体酵素活性の推移を把握することにより、精子被覆抗原と受精能獲得との関連が間接的ながら推察できるものと考えられる。

従来の家兎生殖道における精子の動態に関する研究は、主に子宮内における精子の受精能獲得現象についてであり、交配直後からの精子の動態について、更に子宮腺腔の存在に注目しながら子宮腺腔への精子侵入の意義を受精能との観点から追究しようとした研究は極めて少ない。

本研究では雌生殖道内精子の動態に関する基礎的知見を得ることを目的として、特に子宮腺腔内精子に的を絞り、主に家兎を用い実験を行った。まず、交配後の家兎子宮腺腔内精子の分布を他の家畜(豚、牛)のものと比較しながら、組織学的に詳細な検討を開始し、ついで子宮腺腔内への精子侵入と子宮腺分泌液との関係を組織化学的に捕らえ、更に子宮腺腔内に侵入した精子の機能的変化を追究するため、免疫学的方法により精子被覆抗原の消長を観察し、ついで、子宮腺腔内精子の被覆抗原を推定するためにゲル電気泳動およびゲルクロマトグラフィー法により精子被覆抗原を追究した。また、被覆抗原と受精能獲得との関連を探るため、精子頭部におけるヒアルロニダーゼおよびアクロシン活性の推移も追跡した。

第2章 実験材料および方法

本章では、各章の実験に共通する実験材料および方法について述べる。

1. 供試家兎

本実験では、総数190羽の日本白色種またはニュージャーランド・ホワイト種の成熟末経産家兎または経産家兎(体重3.5~5.9 kg)を供した。これらの家兎は自家繁殖または業者より購入したもので、個別のケージで飼育し、購入家兎の場合少なくとも3週間以上の予備飼育後に実験に用いた。飼料はエンパクとルーサンペレットまたはルーサンペレットのみを不断給餌し、自由に飲水させた。

2. 家兎の交配および排卵誘起法

交配は、繁殖能力を確認した雄家兎のケージ内に、雌家兎を入れ、半強制的に交尾姿勢をとらせ、雄の交尾を誘導した。これら雄家兎は3日以上供用間隔において用いた。

雌家兎1羽に対し2~3の雄家兎を交配させ、その直後に排卵を確実にさせるために、ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン (human Chorionic Gonadotropin, 帝国臓器, 以下, hCG) 20 IU を後耳介静脈内に投与した。

3. 組織標本の作製法

これまでに子宮腺腔内精子を確認した報告は多いが、具体的に腺腔内精子数を示した報告は猿⁵⁶⁾、野兎⁹³⁾および牛¹⁴⁹⁾のみである。いずれも連続切片による組織標本を作製して、光学顕微鏡下で観察する方法がとられている。この手法の利点は雌生殖道全体を固定することにより精子の移動を防止することが可能で、正確に子宮腺腔内精子の位置および精子数を求めることができることである。

本研究においても子宮腺腔内精子を観察するために、組織標本を作製した。組織標本は家兎後耳介静脈からネンブタール (Sodium Pentobarbital) を過剰投与して屠殺し、直ちに生殖器を摘出、子宮を分離して Bouin 液で1~2時間の固定を行った。その後、子宮の上部 (卵管側)、中央部および下部 (頸管側) の3部位に分離し (幅約5mm)、Bouin 液で12時間固定した。固定終了後、常法に従い70~100% アルコール脱水、キシレン透徹を経てパラフィン包埋ブロックを作製した。ついで、ロータリーマイクロームを用い、各部位毎に厚さ約7 μ mの連続切片100枚を作製した。染色はヘマトキシリン・エオジン重染色 (以下, H・E 染色) を施した。

4. 統計的処理法

第3章の精子侵入距離、第4章の蛍光反応率ならびに第5章のヒアルロニダーゼおよびアクロシン活性における差の検定は、Smirnov の方法により棄却検定後、分散分析による均一性の検定を行い、その結果により Student の t-検定または Cochran-Cox の検定を行った。またデータの一部は検定に先立ち角変換を行った。

第3章 子宮腺腔内精子の観察

第1節 ま え が き

哺乳動物の雌生殖道内における精子生存時間は種々の要因によって異なる。一般に精子の生存時間は40時間前後、受精能の持続は20~40時間程度と考えられる⁷⁷⁾。しかし、動物種または個体によって特異的に長時間生存することが報告されている。例えば雌馬生殖道内における精子生存時間は発情持続時間に左右されるが、Day³⁴⁾は排卵の5日前に授精し、6日間生存した精子による受胎を報告している。犬では、Griffiths & Amoroso⁵⁴⁾は交配後84 \pm 12時間受精能力を有すると推測した。一方、

Doak *et al.*³⁶⁾は犬の子宮腔内の生存精子数が交配後4~6日間変化しなかったことを見だし、4頭の内3頭において交配後215時間目の子宮腔に生存精子を確認し、その一部は268時間目においても生存していたと報告した。これらの精子が貯留していた部位は馬では不明であるが、犬では子宮腺であると考えられている。

豚では卵管峽部に精子が移動するのを子宮卵管接合部が抑制し、精子保存部位として作用していることが報告されている¹³³⁾。また、卵管峽部も同様に精子保存部位としての機能を持つともいわれているが、子宮卵管接合部においては粘膜のヒダ間に多数の精子が侵入している像が示されており、これらの部位では白血球の貪食から精子が保護されているとも推察されている。

この様に子宮腺または子宮粘膜のヒダが、精子保存部位として機能することは多くの動物であり得ようである。家兎では子宮腺腔への精子侵入についての報告は見当たらないが、Austin⁵⁾は人工授精後6日目の子宮を洗浄して生存精子を得たと報告している。このことは交配後子宮腔に出現する白血球に精子が貪食されることなく生存していたか、または白血球出現の少ない子宮腺腔のような保存部位に存在していたことを示唆している。従って、家兎精子の生存時間と保存部位との関連を追究するには、まず子宮腺腔内への精子侵入を明らかにする必要がある。そこで本実験では交配後の家兎子宮腺腔内精子を観察し、ついで子宮腺腔内精子と精子運動性との関連を検討すると共に、精子侵入のメカニズムを追究するために、子宮腺分泌液の性状を組織化学的に検討し、更に排卵の有無と子宮腺腔内精子数の変動についても検討した。

第2節 家兎、豚および牛子宮腺腔内精子の観察

1. 目 的

雌家兎生殖道における精子移動に関しては、Overstreet & Cooper¹¹⁵⁾ および Overstreet *et al.*¹¹⁶⁾ が詳細な実験を行い、受精部位である卵管膨大部へ精子が上向するのを抑制している主要部位は卵管峽部であると報告している。また、それと同時に交配後、子宮卵管接合部が関門となり卵管への精子通過を抑制していることも示した。このことは子宮腔に多数の精子が滞留していることを示すと同時に、子宮腺腔内に精子が侵入する可能性のあることを示唆している。

豚で Lewis⁸⁹⁾ は交配後24時間を経過した子宮または卵管内に生存精子を見いだすことは極めて稀であるが、少数例では交配後40時間以上経過した生存精子を確認

できたと報告している。しかし、子宮腺腔内精子の存在については Lovell & Getty⁹⁰⁾ が交配後 10 分から 8.5 時間目までの間で確認しているだけである。

牛においても交配直後から子宮卵管接合部付近の子宮腺腔またはヒダ間に精子が侵入すると報告され、また、これらの部位の精子数は子宮腔内のものより多く、且つ交配後 72 時間目においても存在が確認されている¹⁴⁹⁾。

この様に豚および牛についてなされた報告では子宮腺の精子保存に関する機能についてはほとんど未解明のままである。そこで本実験では、家兎、豚および牛子宮腺への精子侵入状況を知るため交配後経時的に採取した子宮角の組織標本を作製し、光学顕微鏡ならびに走査型電子顕微鏡 (以下, SEM) により観察した。

2. 実験材料および方法

供試材料は、家兎 18 羽、豚 6 頭 (ヨークシャー種) ならびに牛 2 頭 (ホルスタイン種) より得た。家兎は雄家兎 2 羽と交配し、豚は発情発見日またはその翌日に自然交配を行った。牛は発情周期を調節するために、黄体期にプロスタグランジン F_{2α} 類似体 (Ono-L 1052, 小野薬品) 800 μℓ を筋肉内に投与し、更に 14 日後にプロスタグ

ランディン F_{2α} (Upjohn, Co.) 20 mg を同様に投与した。2 回目のプロスタグランジン F_{2α} 投与後 3 日目に凍結精液 0.5 mℓ または 0.25 mℓ を人工授精した。

各動物は交配または人工授精後、Tables 1, 2 および 3 に示す時間に屠殺し、子宮角を摘出、光学顕微鏡ならびに SEM 組織標本を作製した。SEM 試料の作製は子宮角 3 部位の粘膜面を観察対象とし、2.5% グルタルアルデヒド・0.1 M リン酸緩衝固定液 (pH 7.4, 4°C) に浸し、1 時間固定を行い、0.1 M リン酸緩衝液 (以下, PBS) で洗浄後、1% 四酸化オスミウム・リン酸緩衝固定液 (pH 7.4, 4°C) で 1 時間の後固定を行った。固定後、常法に従い 50~100% のエタノール漸強列による脱水および酢酸イソアミル置換処理後、臨界点乾燥を行った。乾燥後の試料は金蒸着を施し、走査型電顕 (日本電子, JSM-T200) を用い、10 または 15 kV の加速電圧で観察した。

3. 結 果

1) 家兎子宮腺腔内精子

家兎子宮腺腔内精子の数および腺腔内での精子の状況は Table 1 に示した通りである。すなわち、子宮腺腔内精子は交配後 2 時間目から見られ、主に子宮下部に多

Table 1. Distribution of rabbit spermatozoa in the uterine glands

Hrs. after mating	Nos. of spermatozoa in the uterine glands at various portions of the uterine horn ^{b)}			Proportion (%) of glandular spermatozoa directed to				Rates (%) of phagocytized spermatozoa	Distance traveled by glandular spermatozoa from endometrial surface ^{d)} (μm) Mean±S.E.
	Upper	Middle	Lower	A ^{c)}	B ^{c)}	C ^{c)}	Unclear		
1	0 ^{a)} 0	0 0	0 0						
2	0 6	0 248	136 2064	59.0	6.7	9.3	21.0	4.0	91± 1.3
4	38 1	27 9	71 213	64.3	13.4	3.7	13.4	5.2	114± 3.7
6	7 1816	0 781	1 864	51.3	18.4	5.9	23.7	0.7	100± 1.1
8	1 65	7 0	27 35	68.9	11.1	5.2	11.1	3.7	101± 8.1
10	141 24	31 40	33 31	59.1	12.0	13.0	11.9	4.0	111± 4.7
24	130 124	105 202	489 514	49.2	9.4	4.6	9.2	27.6	102± 1.1
48	1 2	0 12	1 12	35.7	14.3	17.9	25.0	7.1	231±31.8***
96	0 0	0 0	0 0						

^{a)} Two does were examined each hour after mating. ^{b)} Counts from one hundred serial sections of 7-μm thickness. ^{c)} Sperm heads directed to glandular distal end (A), to glandular opening (B) or parallel with mucosal surface (C). ^{d)} Depth of mucosa was measured. *** Value significantly different from those at 2 to 24 hrs (P<0.001).

く出現した。更に、交配後6時間から10時間目では子宮上部の腺腔内に多数の精子が見られ、子宮角全体の子宮腺腔内に精子の存在することが示された。このような傾向は交配後24時間目まで持続した。しかし、交配後48時間目では、子宮角3部位の腺腔内精子数は急激に減少し、96時間目では子宮腺から消失していた。

一方、交配後2～48時間目の組織切片に観察された子宮腔内精子は少なく、それらの多くは子宮粘膜上皮または多形核白血球と接触していた。

子宮腺腔内精子の多くは腺腔内に遊離した状態で存在したが、稀に子宮腺細胞の表面と接触する精子も見られた (Figs. 1 および 2)。子宮腺腔1カ所当りの精子数は少なく、2～3個であり、一般に集塊状をなすことはなかった。これら精子の多くは頭部を子宮腺底方向 (35.7～68.9%, Fig. 1) に向けていたが、その他に腺開口部 (6.7～

18.4%, Fig. 2) または粘膜上皮と平行方向 (3.7～17.9%) に位置しているものも認められた。この様な子宮腺腔内での状態は交配後の時間経過に伴って変動することは少なかった。一方、交配後2～48時間目の子宮腺腔のいくつかにマクロファージが存在し、精子と接触または精子を貪食していた (0.7～27.6%, Figs. 3 および 4)。特に、交配後24時間目の貪食率は高値であった。

粘膜上皮からの子宮腺腔内精子頭部までの直線距離を測定したところ、91～231 μm を示した。この距離の長いものでは家兎精子の全長の約2倍の値であった。また、この距離は交配後の時間経過に伴う変動は少なかったが、48時間目の子宮腺腔内精子までの距離は他の時間よりも長く、有意の差が認められた ($P < 0.01$)。

SEM による子宮粘膜表面の観察では、明らかに子宮腺開口部に精子頭部を入れ尾部を子宮腔に出している像が見られた (Fig. 9)。この他に子宮粘膜上皮細胞の線毛が精子と接触または巻き付いた像も観察されたが、子宮腺腔内精子と子宮腺開口部の線毛との関係は明らかに出来なかった。

2) 豚子宮腺腔内精子

豚子宮腺腔内精子の数および腺腔内での状況は Tables 2 および 3 に示した通りである。すなわち、子宮腺腔に精子が観察されたのは、6頭のうち2頭のみであり、交配後7時間および26時間10分のものであった (Table 2, Figs. 5 および 6)。他の交配後約43時間から49時間目に屠殺した個体では子宮腺腔内精子は観察されなかった。子宮腺腔内精子が観察された2頭については子宮下部の子宮腺に多くの精子が見られ、それらの精子は互い

Table 2. Existence of uterine glandular spermatozoa in Yorkshire sows examined at various times after mating

Sow no.	Time after mating (hrs.)	Ovulation	Uterine glandular spermatozoa
1	7	—	+
2	26 1/6	—	+
3	42 5/6	+	—
4	43 3/4	+	—
5	43 11/12	+	—
6	49 1/6	+	—

+, positive; —, negative.

Table 3. Distribution of porcine and bovine spermatozoa in the uterine glandular lumen

Animals	Animal no.	Uterine horn (side)	Nos. of spermatozoa in the uterine gland at various portions of the uterine horn ^{a)}			Proportion (%) of glandular spermatozoa directed to				Rates (%) of phagocytized spermatozoa	Distance traveled by glandular spermatozoa from endometrial surface ^{e)} (μm) Mean \pm S.E.
			Upper	Middle	Lower	A ^{b)}	B ^{b)}	C ^{b)}	Unclear		
Sow	1	Right	750	1,426	3,556	94.2	2.2	1.0	1.7	0.9	231 \pm 2.3
	2	Right	84	117	283	91.6	4.3	3.1	1.0	0	222 \pm 8.0
Cow ^{d)}	1	Right	417	207	176	60.8	13.3	6.3	19.3	0.3	238 \pm 11.2
	2	Left	96	37	98	54.8	9.6	7.8	27.8	0	355 \pm 15.4
	2	Right	258	86	192	69.8	10.1	6.3	13.4	0.4	375 \pm 7.2

^{a)} Counts from one hundred serial sections of 7- μm thickness. ^{b)} Sperm heads directed to the glandular distal end (A), to glandular opening (B) or parallel with mucosal surface (C). ^{c)} Depth of mucosa was measured. ^{d)} Cows were slaughtered 24 hours after insemination.

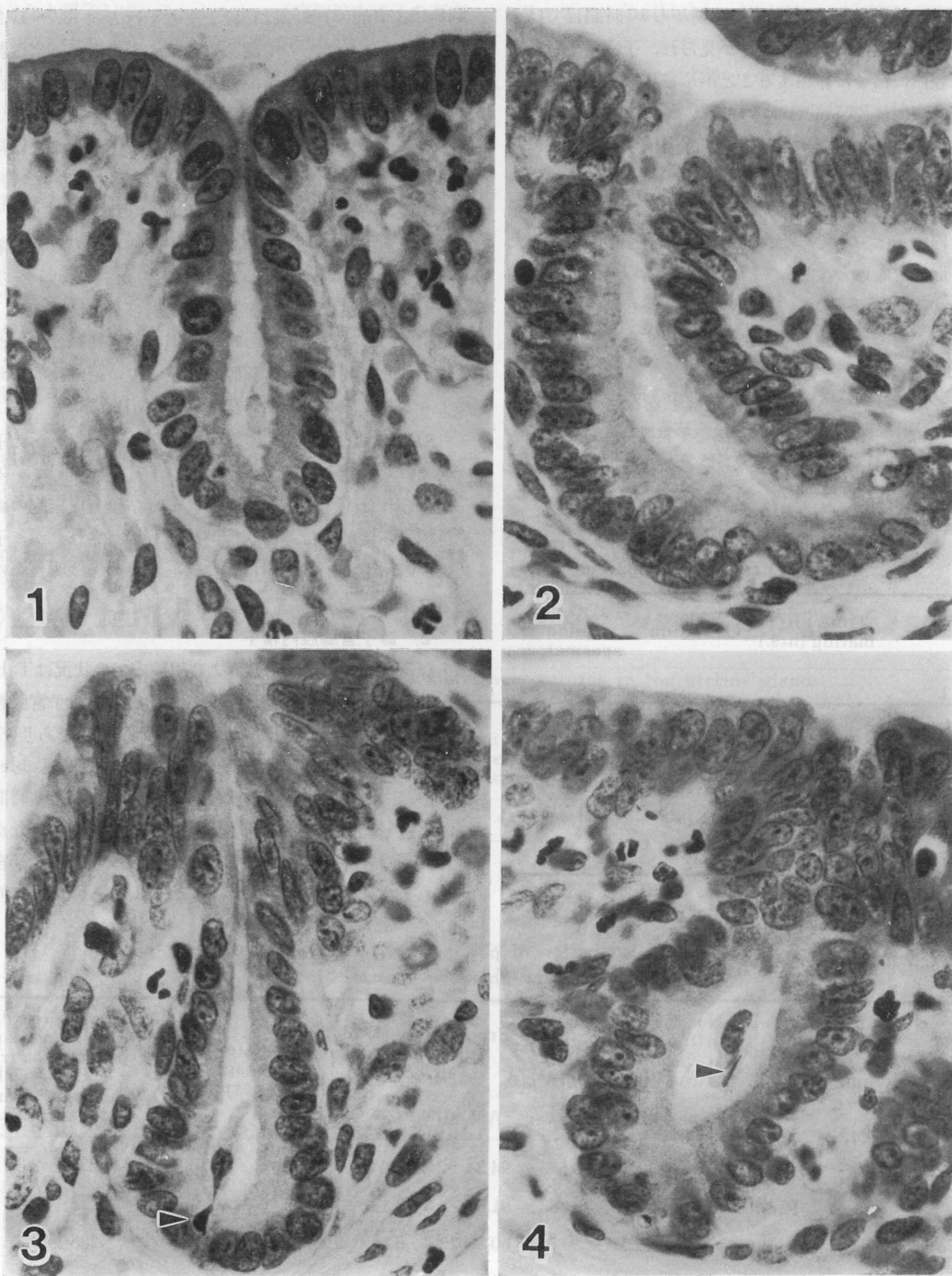


Plate 1. Light micrographs of the rabbit uterine gland examined 4 hours after mating.

Figs. 1 and 2. Sperm heads in the uterine gland directed toward the distal end of the gland (Fig. 1), and toward the glandular opening (Fig. 2). $\times 750$.

Fig. 3. A macrophage (arrow) migrating through the glandular epithelium by means of ameboid movement. A part of the nucleus (arrow) still remains in the glandular epithelium. $\times 750$.

Fig. 4. A phagocytized sperm head (arrow) is located in a glandular macrophage. $\times 675$.

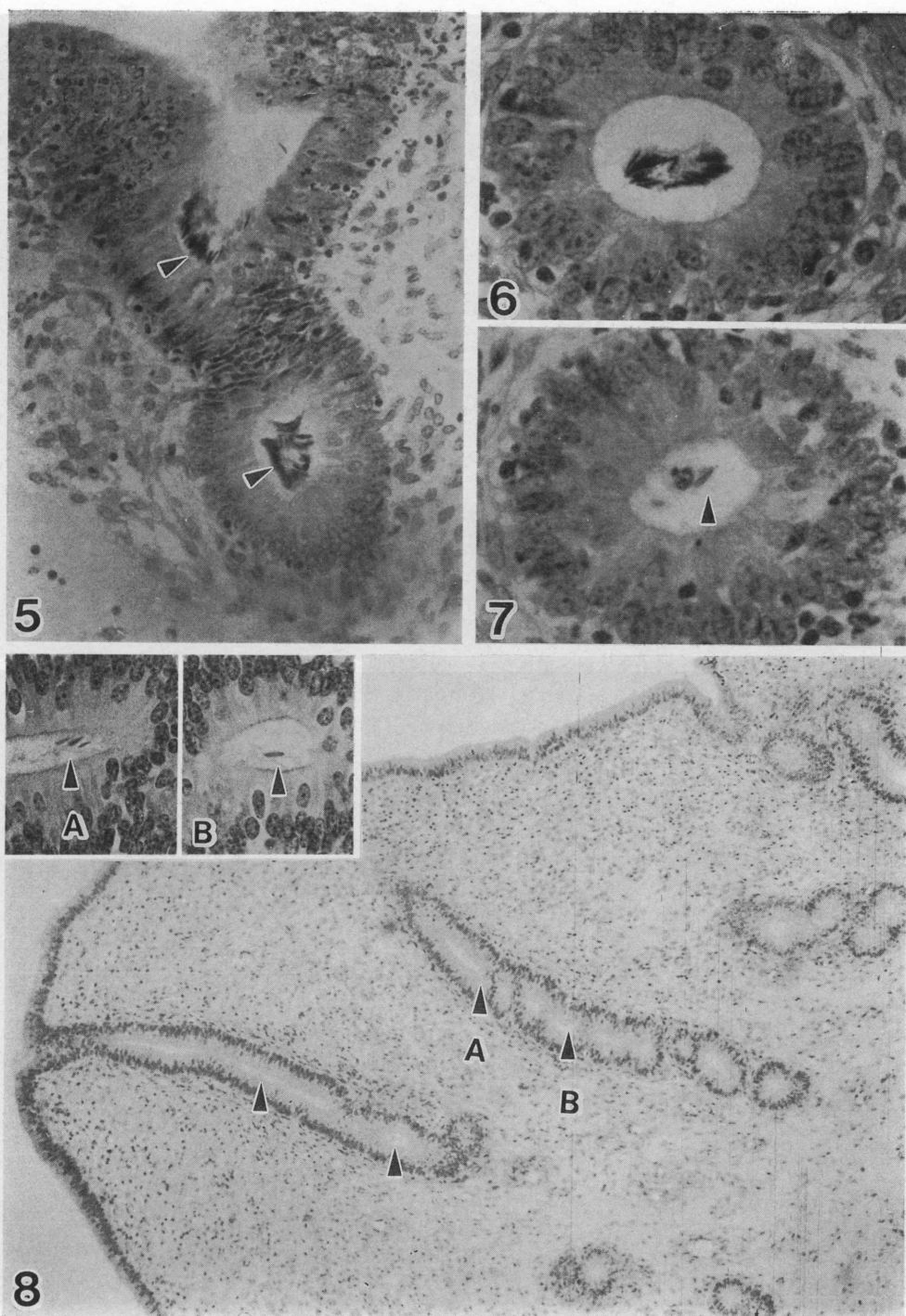


Plate 2. Light micrographs of porcine and bovine uterine glandular spermatozoa (arrows).

Figs. 5, 6, and 7. The uterine glands of a sow, 7 hours after mating. An aggregation of spermatozoa in the glandular opening (Fig. 5. $\times 410$) and in the lumen of a glandular tubule at about $195\ \mu\text{m}$ depth from the endometrial surface (Fig. 6. $\times 750$) is noted. A polymorphonuclear leukocyte in the uterine lumen, containing the remnant of a sperm head (arrow) is seen. Some polymorphonuclear leukocytes appear in the tissue surrounding the glandular epithelial cells (Fig. 7. $\times 750$).

Fig. 8. Spermatozoa in the uterine glands of a cow, 24 hours after artificial insemination (arrows). $\times 175$. Inset is a high magnification of the areas shown by arrows in Fig. 8 (A and B). $\times 600$.

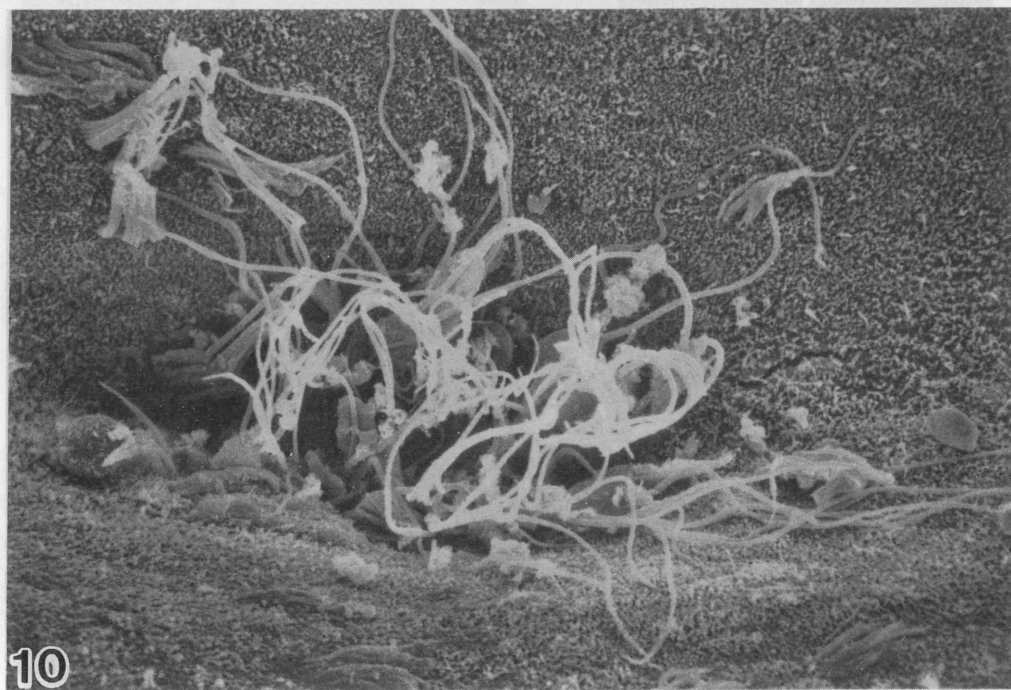
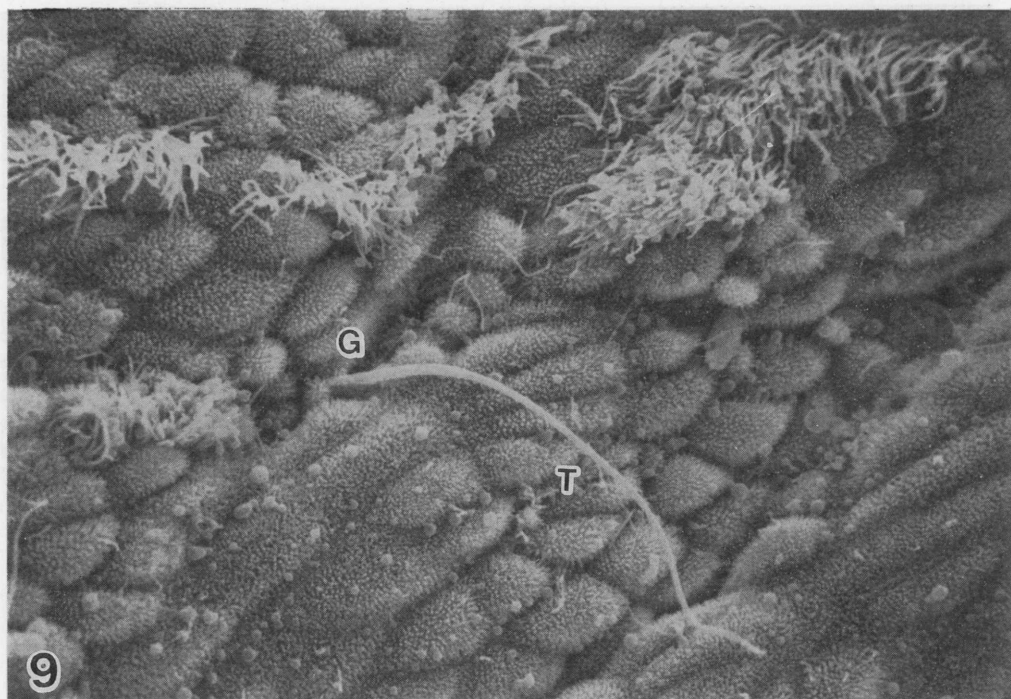


Plate 3. Scanning electron micrographs of spermatozoa around the glandular openings.

Fig. 9. Wavy tail (T) of rabbit sperm with head penetrating the uterine gland (G) 4 hours after mating. $\times 2300$.

Fig. 10. Crowded porcine spermatozoa penetrating the glandular opening, with tails extending into the uterine lumen 7 hours after mating. $\times 1700$.

に頭部を接触し腺腔中央部に存在していた (Fig. 6)。このような精子頭部の凝集は子宮腺開口部付近で多く観察された (Fig. 5)。子宮粘膜から子宮腺腔内精子までの距離は平均 $231\ \mu\text{m}$ と $222\ \mu\text{m}$ で、この距離は子宮内膜機能層に分布する子宮腺の距離に相当し、更に深い子宮腺末端部にまで達した精子は見られなかった。

豚子宮腺腔における精子の貪食は多形核白血球によるものであり (Fig. 7)、2頭の内1頭の子宮腺で観察された。しかし、その値は低く 0.9% であった。

子宮粘膜表面の SEM 観察では、広く開口した子宮腺に、光顕像と同様に、精子が頭部を先にして多数集まり、尾部を子宮腔に出している像が観察された (Fig. 10)。この像は精子自らの運動性により腺開口部に集まっていることを示しているものと思われる。

3) 牛子宮腺腔内精子

供試牛のうち1頭は屠殺時に排卵前であり、左右の子宮角粘液内には生存精子が確認された。従って、この個体については左右子宮角の組織標本を作製した。他の1頭は人工授精時に排卵しており、屠殺後の顕微鏡検査では粘膜内に精子は存在しなかったので右子宮角のみ観察した。子宮粘膜表面の SEM 観察では腺開口部に頭部を入れている精子は見られなかったが、組織切片観察では2頭とも子宮腺腔内に精子が観察された (Table 3, Fig. 8)。子宮角3部位の子宮腺腔内精子数は、Table 3 に示すように 37~417 の範囲を示し、特に子宮角上部で多くなる傾向が見られた。これらの精子の多くは子宮腺腔方向に頭部を向け (54.8~69.8%)、マクロファージによる精子貪食率は極めて少なかった (0~0.4%)。子宮粘膜上皮から腺腔内精子頭部までの距離は $238\sim375\ \mu\text{m}$ で、左右両子宮角間に差はなく、家兎ならびに豚精子と比較し、子宮腺腔の深部に存在することが確認された。

第3節 家兎生存精子および死滅精子の子宮内注入が子宮腺腔内精子数に及ぼす影響

1. 目的

前節で述べたように交配後の家兎、豚および牛で子宮腺腔内精子が確認され、腺腔内での状況より精子自らの運動性により子宮腺腔内に侵入したものと推察された。そこで本実験では、精子運動性と子宮腺腔内精子との関連を明らかにするため、雌家兎 20 羽を用い、採取直後の生存精子または死滅精子を子宮内に注入し、子宮腺腔内精子数の変動を観察し、精子運動性の影響を調べようとした。

2. 実験材料および方法

供試精液は雌家兎 2~3 羽から人工腔法で採取し、膠

様物質を除去後、混合した全精液 (以下、家兎生存精子) ならびに全精液を液体窒素ガスと 37°C の温湯中で凍結融解を 3~4 回反復し、精子運動性を完全に消失させたもの (以下、死滅精子) を用いた。また、精子運動性が高く、家兎腔液中で家兎精子よりも活発な前進運動を示す牛精子 (ホルスタイン種、以下、牛生存精子) を用い、家兎精子と比較した。

家兎および牛生存精子の子宮内授精は雌家兎に hCG (20 IU) を投与し、10~15 分間経過した後、ネンブータル麻酔下で腹側正中線を切開し、生殖器を露出後、先端を丸めた長さ 10 cm の注射針を腔から子宮頸管を経て右子宮角内に挿入し、精液を 0.5 ml (精子数: 200×10^6 , 子精活力: 75 卅以上) 注入した。家兎死滅精子は左右の子宮角に注入し、左子宮角については子宮卵管接合部ならびに子宮頸への移行部を結紮し、精液の卵管または腔の流出を防いだ場合の子宮腺腔内精子についても検討した。

子宮腺腔内の精子数は、家兎ならびに牛生存精子の注入では 4, 10, 48 および 96 時間後、家兎死滅精子注入では 2, 4, 10, 48 および 96 時間後に第2章で述べた方法により組織標本を作製、100 枚の連続切片を観察して求めた。また、家兎生存精子注入個体については SEM 観察も行った。

3. 結果

1) 生存精子注入後の子宮腺腔内精子

Tables 4 および 5 は家兎ならびに牛生存精子を子宮内腔に注入した後の子宮腺腔内精子の数と腺腔内での状況をまとめたものである。すなわち生存精子の注入では、注入後 4 時間目および 10 時間目に子宮腺腔内精子が観察され (Figs. 11 および 12)、両時間における精子数は家兎 146~5,264 個、牛 233~51,730 個の範囲を示した。これらの値は第2節の交配後における家兎精子に比較し、一般に高かった。それら精子の子宮腺腔内における分布状態は、注入後 4 時間目では精子頭部を子宮腺腔方向に位置するものが最も多く家兎では 63.7%、牛では平均 65.8% を示した。精子貪食率は 4 時間目では低く、家兎 4.2%、牛平均 9.0% であったが、10 時間目では急増し、家兎 42.6%、牛平均 68.1% を示した。一方、子宮腺腔内精子は家兎および牛精子ともに 48 時間目以降消失していた。

家兎生存精子を注入した後の SEM 観察では、交尾後の精子と異なり 1 か所の子宮腺に数個の精子が頭部を入れている像が見られた (Figs. 14~16)。これは生存精子を子宮角に直接注入すると子宮腺腔内精子数が多くなることを示している。

Table 4. Distribution of rabbit spermatozoa in the uterine glands after intrauterine insemination with motile rabbit spermatozoa

Hrs. after mating	Nos. of spermatozoa in the uterine glands at various portions of the uterine horn ^{b)}			Proportion (%) of glandular spermatozoa directed to				Rates (%) of phagocytized spermatozoa	Distance traveled by glandular spermatozoa from endometrial surface ^{d)} (μm) Mean±S.E.
	Upper	Middle	Lower	A ^{c)}	B ^{c)}	C ^{c)}	Unclear		
4	2876 ^{a)}	5264	320	63.7	7.3	12.1	12.7	4.2	94±2.1
10	1133	146	383	45.5	3.4	1.0	7.5	42.6	89±1.5
48	0	0	0						
96	0	0	0						

^{a)} One doe was examined each hour after mating. ^{b)} Counts from one hundred serial sections of 7-μm thickness. ^{c)} Sperm heads directed to glandular distal end (A), to glandular opening (B) or parallel with mucosal surface (C). ^{d)} Depth of mucosa was measured.

Table 5. Distribution of bovine spermatozoa in the rabbit uterine glands after intrauterine insemination with motile bovine spermatozoa

Hrs. after mating	Nos. of spermatozoa in the uterine glands at various portions of the uterine horn ^{b)}			Proportion (%) of glandular spermatozoa directed to				Rates (%) of phagocytized spermatozoa	Distance traveled by glandular spermatozoa from endometrial surface ^{d)} (μm) Mean±S.E.
	Upper	Middle	Lower	A ^{c)}	B ^{c)}	C ^{c)}	Unclear		
4	657 ^{a)}	400	510	66.5	11.9	4.6	8.2	8.8	169±4.3
	6205	51730	26100	65.0	13.4	4.6	7.7	9.2	151±1.6
10	233	374	685	11.9	4.8	2.5	3.4	77.5	138±4.1
	6560	5201	8090	33.0	5.5	1.2	1.2	58.7	125±3.7
48	0	0	0						
96	0	0	0						

^{a)} Two does were examined 4 and 10 hours after mating. One doe was examined 48 and 98 hours after mating, respectively. ^{b)} Counts from one hundred serial sections of 7-μm thickness. ^{c)} Sperm head directed to glandular distal end (A), to glandular opening (B) or parallel with mucosal surface (C). ^{d)} Depth of mucosa was measured.

2) 死滅精子注入後の子宮腺腔内精子

Tables 6 および 7 は家兎死滅精子を注入したときの子宮腺腔内精子数および腺腔内における精子の状況を示したものである。子宮腺腔内精子数は、子宮角の結紮の有無により変動したが、一般に少ないものであった (Fig. 13)。

無結紮子宮角では注入後2時間目から48時間目まで子宮腺腔内精子が観察されたが、その数は0~98と極めて少なく、それら精子の多くは、子宮腺腔で遊走細胞に貪食されており、その値は42.0~100%に達していた (Table 6)。

結紮子宮角では無結紮子宮角に比較し、子宮腺腔内精子数は多くなる傾向が見られ、最大568個を数えた。ま

た、精子は結紮後69時間目においても腺腔内に観察された。しかし、子宮腺腔内精子の貪食率は無結紮子宮角と同様に高く55.8~99.3%の範囲を示し、注入後2時間で88.8%の精子が貪食されていた (Table 7)。

以上のように、子宮腺腔内精子は生存精子で多く、死滅精子で少ないことが明らかとなり、子宮腺腔内精子の多くは自らの運動性により侵入したものと考えられた。また、それと同時に、死滅精子を注入して子宮角を結紮すると子宮腺腔内精子数が多くなることから、子宮の収縮による内圧の上昇のような精子運動以外の要因の存在が示された。しかし、死滅精子は子宮腺腔内で遊走して来た白血球またはマクロファージにより、短時間にほとんど貪食されてしまうことも明らかとなった。

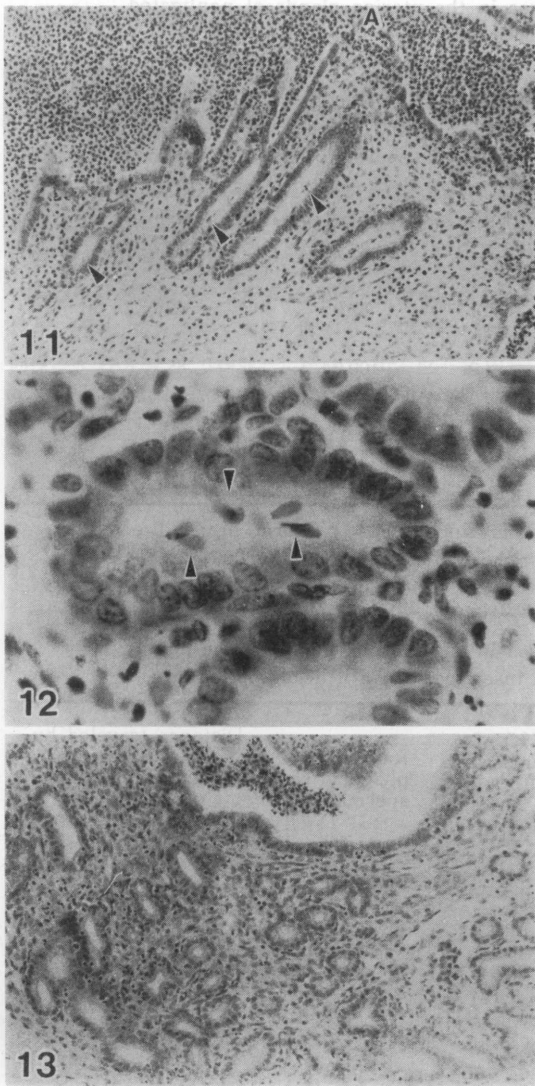


Plate 4. Distribution of rabbit spermatozoa in the uterus after intrauterine insemination. H.E. staining.

Fig. 11. Spermatozoa (arrows) in the uterine glands of the rabbit 4 hours after intrauterine insemination with motile spermatozoa. Many leukocytes migrated from endometrium to uterine cavity (A). $\times 112$.

Fig. 12. Bull spermatozoa (arrows) in the rabbit uterine glands 4 hours after intrauterine insemination. $\times 560$.

Fig. 13. Rabbit uterus 4 hours after intrauterine insemination with dead spermatozoa. Spermatozoa in uterine glands are not located. $\times 112$.

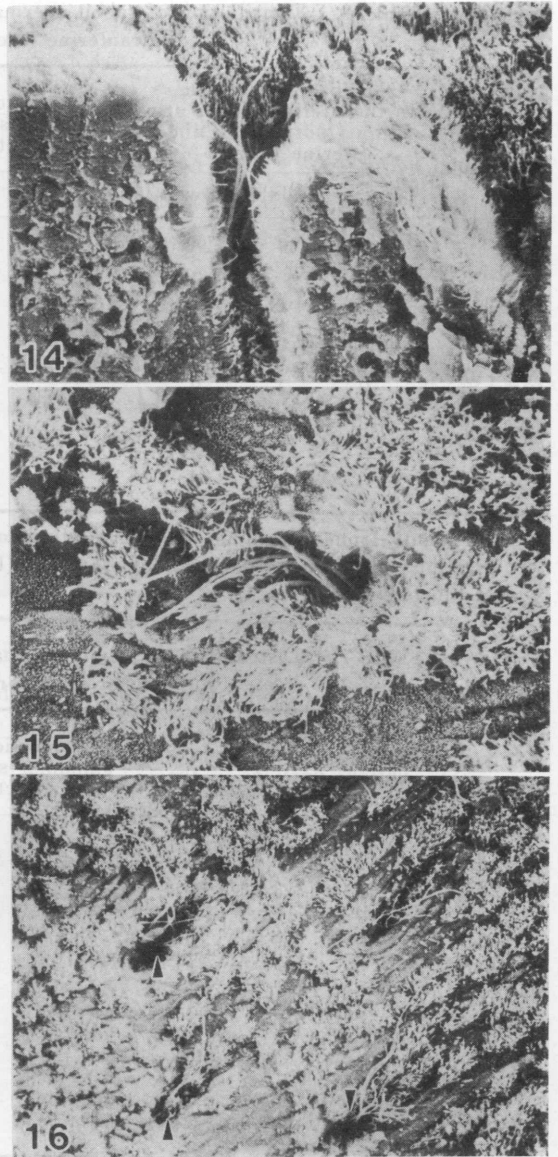


Plate 5. Scanning electron micrographs of rabbit spermatozoa around the glandular openings 4 hours after intrauterine insemination with motile spermatozoa.

Fig. 14. Rabbit glandular opening in fractured uterine specimen. Four spermatozoa penetrating the uterine gland. $\times 910$.

Figs. 15 and 16. Spermatozoa penetrating the most of the glandular opening (arrow). $\times 420$.

Table 6. Distribution of rabbit spermatozoa in the uterine glands of nonligated uterus after intrauterine insemination with dead spermatozoa

Hrs. after mating	Nos. of spermatozoa in the uterine glands at various portions of the uterine horn ^{a)}			Proportion (%) of glandular spermatozoa directed to				Rates (%) of phagocytized spermatozoa	Distance traveled by glandular spermatozoa from endometrial surface ^{c)} (μ m) Mean \pm S.E.
	Upper	Middle	Lower	A ^{b)}	B ^{b)}	C ^{b)}	Unclear		
2	98 0	17 12	28 2	9.2	1.0	1.0	2.1	86.7	77 \pm 5.4
4	0 0	0 0	19 0	15.8	21.1	0	21.1	42.0	82 \pm 4.7
10	20 0	43 1	33 0	0	0	0	0	100.0	85 \pm 6.5
48	12 0	28 28	40 16	29.2	15.0	8.7	2.5	44.6	150 \pm 11.7
96	0	0	0						

^{a)} Counts from one hundred serial sections of 7- μ m thickness. ^{b)} Sperm heads directed to glandular distal end (A), to glandular opening (B) or parallel with mucosal surface (C). ^{c)} Depth of mucosa was measured.

Table 7. Distribution of rabbit spermatozoa in the uterine glands of the doubly ligated uterus after intrauterine insemination with dead spermatozoa

Hrs. after mating	Nos. of spermatozoa in the uterine glands at various portions of the uterine horn ^{a)}			Proportion (%) of glandular spermatozoa directed to				Rates (%) of phagocytized spermatozoa	Distance traveled by glandular spermatozoa from endometrial surface ^{c)} (μ m) Mean \pm S.E.
	Upper	Middle	Lower	A ^{b)}	B ^{b)}	C ^{b)}	Unclear		
2	48 0	23 8	14 2	10.2	0	1.0	0	88.8	144 \pm 10.9
4	12 6	83 17	105 24	4.0	0	0.3	0	95.7	133 \pm 6.8
10	72 65	124 172	108 224	0.3	0.4	0	0	99.3	94 \pm 4.4
48	168 0	212 8	568 8	13.6	14.6	14.4	1.6	55.8	123 \pm 4.4
96	121	109	205	9.4	12.6	8.6	10.5	58.9	103 \pm 5.5

^{a)} Counts from one hundred serial sections of 7- μ m thickness. ^{b)} Sperm heads directed to glandular distal end (A), to glandular opening (B) or parallel with mucosal surface (C). ^{c)} Depth of mucosa was measured.

第4節 家兎子宮腺腔内精子に及ぼす 排卵誘起刺激の影響

1. 目 的

交配後に精子が子宮腺腔内に長時間存在することについては、Doak *et al.*³⁶⁾ が犬において交配後 268 時間目の子宮腺腔に精子の存在することを確認し、子宮腺腔の精子滞留期間は発情持続時間と関連があると推察した。

また、本研究の第3章、第2節で示したように、豚で子宮腺腔内精子が観察されたのは排卵前の個体のみで、すでに排卵していた個体では全く観察されなかった。このことは発情と排卵に伴い子宮腺腔内精子が移動していることを示唆している。しかし、これらのことを検討した報告は見当らず、子宮腺腔内精子の意義を知るには、まず、排卵との関係を把握しておく必要がある。

2. 実験 I: hCG またはインドメサシン投与が

子宮腺腔内精子数に及ぼす影響

1) 実験材料および方法

総数 20 羽の家兎を用い、排卵誘起刺激または排卵抑制効果が子宮腺腔内精子の移動にどのような影響を及ぼすかについて、組織標本作製し観察した。実験は排卵刺激のない hCG 無投与区、排卵を誘起する hCG 投与区および排卵誘起を行った後、排卵を抑制するインドメサシン⁴²⁾投与区に分けて行った。hCG 無投与区は hCG 投与を行わずに、ネンブータル麻酔下で開腹し、前章と同様に人工腔法により採取した精液 0.2 ml を子宮内に注入した。hCG 投与区は hCG (20 IU) を投与し、10 分間経過後、無投与区と同様に精液を注入した。インドメサシン投与区は雄家兎 2 羽と交配し、直ちに hCG (20 IU)

を投与、更に 6 時間目に PBS (pH 8.5) に溶解した 1% インドメサシン (Sigma) 液 5 ml を頸部皮下に注射した。各処理を施した家兎は 1, 2, 4, 5 および 7 日後に屠殺し、左子宮角の子宮卵管接合部に注射針を刺し、37°C に加温した 5% 牛血清アルブミンを含む Tyrode 液 0.5 ml で子宮腔内を灌流し、子宮下部から精子を回収した。更に、子宮粘膜表面に附着している精子も回収するため、0.5% ドデシル硫酸ナトリウム液 0.5 ml で同様に灌流し回収した¹¹⁵⁾。精子生存率は Tyrode 液に含まれる精子から求め、精子数は両回収液から求めた。しかし、精子生存率は回収精子数が少なかったため、約 100 個の精子を観察し、その中に含まれる生存精子数から算定した。右子宮角からは組織標本作製し、子宮腺腔内精子を検索した。

Table 8. Effect of hCG or indomethacin administration on the distribution of spermatozoa in the rabbit uterus after intrauterine insemination with motile spermatozoa

Experimental treatment	Days after insemination	Mean no. of spermatozoa in the uterine glands (Range) ^{a)}	Mean rates (%) of phagocytized spermatozoa (Range) ^{a)}	Spermatozoa in the uterine cavity ^{b)}	
				Sperm Conc. ($\times 10^3/\text{ml}$)	Sperm motility
Control	1	149 (59-241)	37.4 (26.6-50.8)	127.0	32
	2	43 (28- 62)	14.4 (14.3-14.5)	0	
	4	2 (0- 6)	16.7 (0 -33.3)	0	
	5	243 (185-341)	6.8 (3.0-14.1)	0	
	7	0		0	
hCG (20 IU) administration	1	9 (5- 15)	60.0 (40.0-73.3)	0	
	2	25 (5- 63)	23.1 (20.0-28.6)	0	
	4	0		0	
	5	0		0	
	7	0		0	
1% indomethacin administration (5 ml)	1	75 (62- 97)	24.5 (21.6-26.2)	1.6	25
		66 (24- 89)	53.2 (45.2-58.3)	17.9	34
	2	835 (684-913)	32.0 (7.9-44.4)	0	
		2 (0- 4)	12.5 (0 -25.0)	0	
	4	3 (0- 5)	0	0	
		0		0	
	5	1 (0- 2)	100	0	
		1 (0- 2)	0	0	
	7	0		0	
		0		0	

^{a)} Uterine horns divided into upper, middle and lower portions and sperm counts from one hundred serial sections of 7- μm thickness in each portions. ^{b)} Spermatozoa were recovered from uterus with 0.5 ml of Tyrode's and 0.5% sodium dodecyl sulfate solutions after intrauterine insemination.

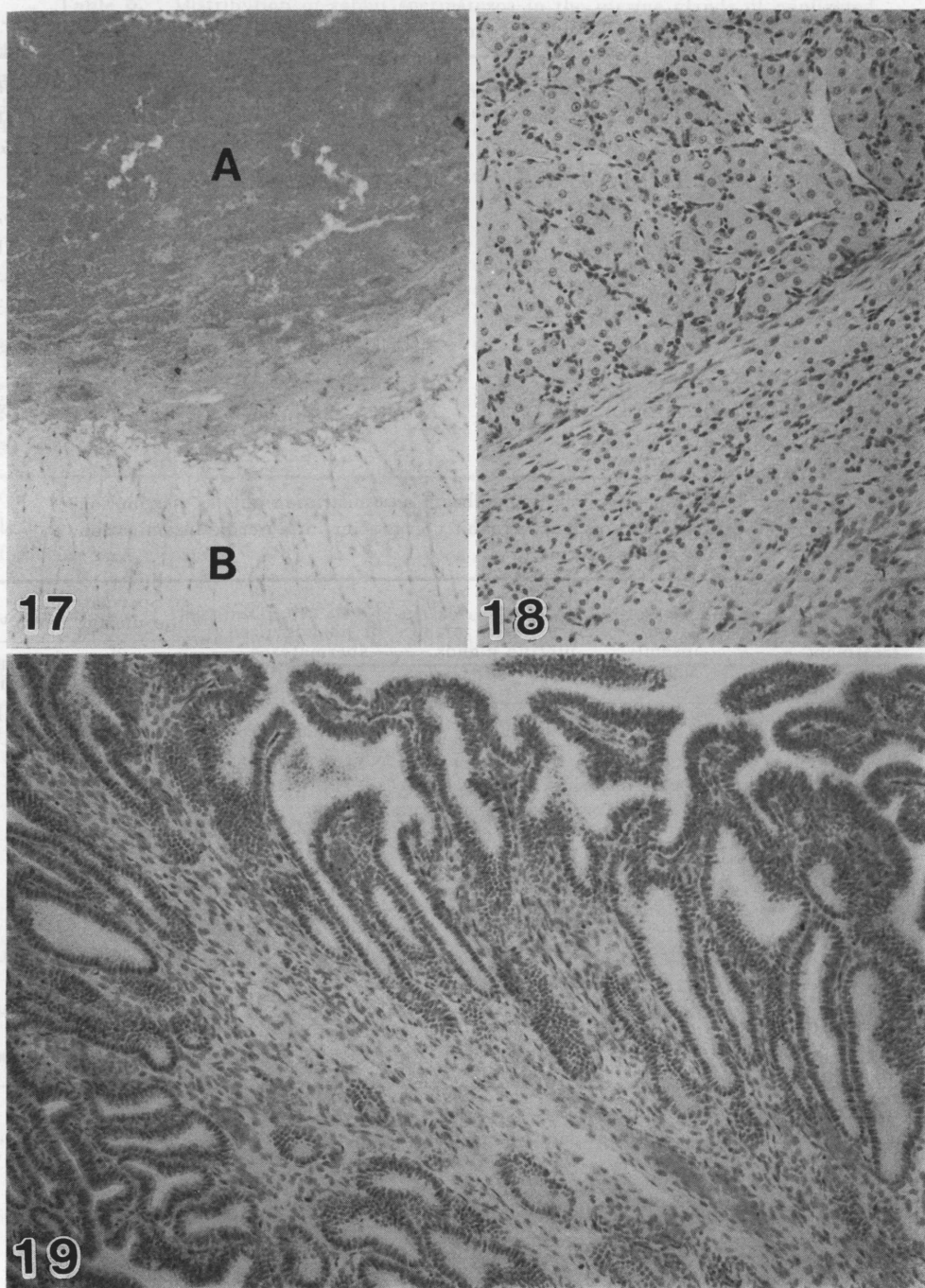


Plate 6.

Fig. 17. Section of rabbit ovarian follicle 7 days after administration of 5 ml of 1% indomethacin. Follicle filled with blood cells (A). $\times 130$.

Fig. 18. Section of rabbit ovarian follicle 5 days after administration of 5 ml of 1% indomethacin. Follicular cells denaturalized into luteinized follicle. $\times 530$.

Fig. 19. Rabbit uterine epithelium 5 days after administration of 5 ml of 1% indomethacin. $\times 130$.

2) 結 果

卵巣表面の排卵点を観察し、排卵の有無を確認したところ、hCG 投与区のみが排卵し、hCG 無投与区およびインドメサシン投与区では排卵は認められなかった。しかし、インドメサシン投与区では胞状卵胞に血液が浸潤した血胞が出現し (Fig. 17), 交配後 4 日目以降では顆粒細胞層が黄体細胞化している像が観察された (Fig. 18)。また、子宮内膜の形態は発情期のそれとは異なり、内膜ヒダの分岐が進行し、黄体期像を示していた。このことはインドメサシン投与により、排卵が抑制されたとしても卵胞の一部は黄体化し (Fig. 17 の B), 子宮内膜も黄体期変化を呈したものである。

3 処理区とも子宮上部、中央部および下部の 3 部位間に、回収精子数、子宮腺腔内精子数および食率に差は認められなかった。そこで 3 部位の連続切片 100 枚に観察された子宮腺腔および子宮腔内の精子数をまとめて Table 8 に示した。子宮腺腔内精子数は個体により変動したが、hCG 投与区では注入後 2 日目、hCG 無投与区およびインドメサシン投与区では交配後 5 日目まで子宮腺腔内精子が観察された。特に、hCG 無投与区の 5 日目では精子数が多く、185~341 個、平均 243 個を数えた。

一方、子宮からの回収精子数は hCG 無投与区では、2 日目、hCG 投与区では 1 日目、インドメサシン投与区では 2 日目ですでに精子が消失していた。このことは子宮腔内精子が、交配または注入後の日数経過に伴い子宮腺腔内精子よりも速く消失していることを示している。

3. 実験 II: 精子注入後、hCG 投与までの日数が子宮腺腔内精子数に及ぼす影響

1) 実験材料および方法

実験 I において、子宮腺腔に精子が存在する時期は hCG 投与区に比較し、排卵誘起刺激のない hCG 無投与区で長くなることが確認された。そこで排卵刺激と子宮腺腔内精子の移動との関係を更に検討するため、実験 II では子宮腺腔内精子数および子宮腔内を灌流して得られた回収精子数が、精液注入後の排卵刺激に対し、どのように変動するか観察した。このために 25 羽の家兔を用い、子宮角に精液を注入し、その後 1~5 日の間隔において排卵誘起刺激を与えた。

一方、子宮腺腔内精子による受精、すなわち、子宮腺腔内精子が子宮腺腔から出て、受精に関与することを直接証明することは極めて困難である。しかし、間接的方法にしても、その可能性を探ることは、子宮腺腔内精子の意義を知るうえにも必要なことと考えられる。そこで子宮角への精液注入後、排卵を誘起し、受精卵の採取を試みた。

子宮角への精液注入は、人工腔により採取した精液を左右子宮角中央部の子宮腔内に 0.3~0.4 ml ずつ注入した。精液注入後 1, 2, 3, 4 および 5 日目に排卵誘起のため hCG を 30~50 IU 投与し、hCG 投与後 19~24 時間目にネンブタール麻酔下で屠殺、子宮角および卵管を摘出した。子宮腺腔内精子数は右子宮角を上部、中央部および下部の 3 部位に分けて組織標本を作製し、連続切片 100 枚を検索し求めた。左子宮角は、実験 I と同様に子宮腔内を灌流して精子を回収し、精子数ならびに精子生存率を算定した。

採卵は、卵管を子宮から分離し、卵管采にピペットを挿入し、灌流液 (滅菌生理食塩水) を送り、左右両側の卵管内卵子を時計皿に回収した。卵の検索は実体顕微鏡および位相差顕微鏡を用い、主に第 2 極体放出の有無を調べた。

2) 結 果

精液注入後 1~5 日目に排卵誘起したときの子宮腺腔内精子数、子宮腔内回収精子数および回収精子の生存率は Table 9 に示した通りである。すなわち、子宮腺腔内精子数は、一般に少なく注入後日数の経過に伴い減少傾向が見られ、特に 3 日目から急減した。この様に子宮腺腔内精子数が低値であったのは、精子数を観察したのが hCG 投与後 24 時間目であり、実験 I の hCG 投与区と比較したところ、概ね類似した傾向であることが認められた。このことは精子注入後 hCG 投与までの時間経過に伴い、子宮腺腔内精子数は漸減するものの、子宮腺腔内の精子滞留時間は、注入後直ちに hCG を投与したものに比べ長くなっていることを示している。

子宮腔内を灌流して得られた回収精子は、精液注入後 4 日目まで観察され、精子生存率の平均値は 1 日目の 29% から漸減する傾向が見られたが、4 日目においても 19% と生存精子を得ることができた。

hCG 投与による排卵誘起後 19~24 時間目に、卵管から採取された卵数は Table 10 に示した通りである。排卵は供試家兔全例で得られ、排卵点観察による平均排卵数は通常のとおりで差はなかったが、極体 2 個を有する卵の得られた家兔数は 1~2 羽 (20~40%)、また、その卵の出現率は 2.1~20% と極めて低値であった。しかし、精液注入後 1~4 日目まで極体 2 個を有する卵を得ることができ (Figs. 20 および 21), 中には精子侵入卵と判断される囲卵腔内に侵入した補足精子を認めたものもあった。一般には卵への精子侵入により第 2 極体が放出されるといわれているので、本実験で観察された第 2 極体の放出は精子侵入の可能性の大きいことを示している。

実験 I の hCG 無投与区では精液注入後 1~5 日目ま

Table 9. Effect of intervals from intrauterine insemination to hCG injection on the rabbit spermatozoa distribution in the uterus

Days after intrauterine insemination	Animals	Mean nos. of spermatozoa in the uterine glands (range) ^{a)}	Spermatozoa in the uterine cavity ^{b)}	
			Sperm Conc. (×10 ⁴ /ml)	Motility (%)
1	5	20.0 (0.3– 51.3)	2.8 (0.5-8.5)	29 (4-40)
2	5	41.7 (4.3-111.0)	3.0 (1.5-5.5)	32 (14-50)
3	5	6.1 (0 – 7.3)	0.4 (0 –1.0)	33 (29-40)
4	5	1.3 (0 – 5.0)	1.0 (0.5-1.5)	19 (6-30)
5	5	6.2 (0 – 31.0)	0	

a) Counts from one hundred serial sections of 7-μm thickness. b) Spermatozoa were recovered from the uterus with 0.5 ml of Tyrode's and 0.5% sodium dodecyl sulfate solutions after intrauterine insemination.

Table 10. Effect of intervals from intrauterine insemination to hCG injection on number of rabbit eggs with the secondary polar body

Days after intrauterine insemination	Animal nos. of ovulated	Total nos. of eggs recovered	Recovery rates (%)	Total nos. of eggs with secondary polar body
1	5	40	8.0	8
2	5	47	9.4	1
3	5	50	10.0	3
4	5	41	8.2	3
5	5	29	1.2	0

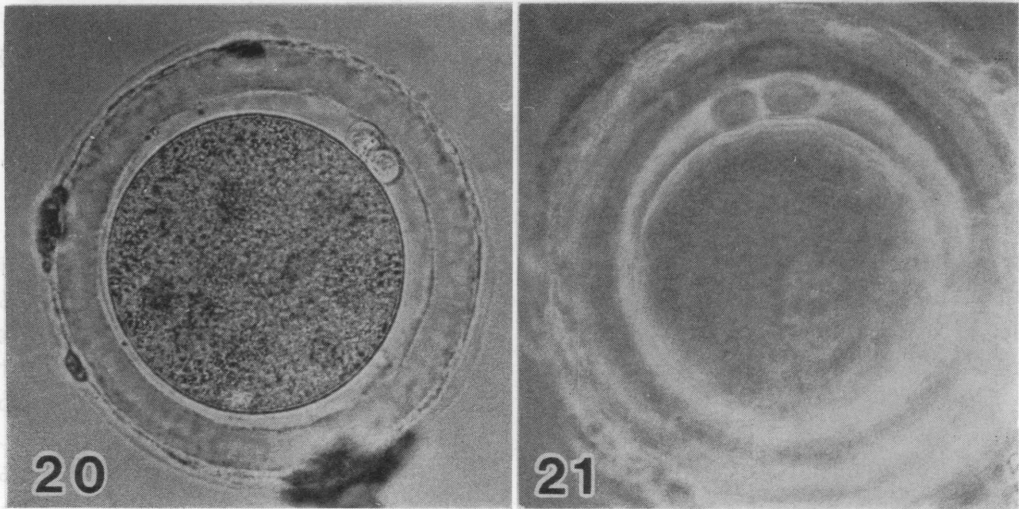


Plate 7. Phase-contrast photographs of the first and second polar bodies of the rabbit eggs.

Fig. 20. Rabbit egg recovered from oviducts following hCG (20 IU) injection 2 days after intrauterine insemination with motile spermatozoa. ×400.

Fig. 21. Rabbit egg recovered from oviducts following hCG (20 IU) injection 4 days after intrauterine insemination with motile spermatozoa. ×400.

で子宮腺腔内に精子が認められたのに対し、子宮腔内から精子が回収できたのは1日目までであり、その後は全く得ることができなかった。しかし実験 II では4日目の hCG 投与で子宮腔内から生存精子が回収された。すなわち、hCG の影響により、子宮腺腔内精子が子宮腔へ出て卵管に移動した可能性を示唆するものである。

第5節 家兎および豚子宮腺の組織化学的観察

1. 目 的

前述の実験結果から、子宮腺腔内精子は、主に精子自身の能動的運動性により侵入したもので、精子は子宮腺分泌液に対し、走流性または走化性を有するものではないかと推察される。一般に家畜の子宮液は発情期や、外因性ホルモンにより分泌量に顕著な変化が見られ^{15~17,27)}、家兎の分泌量は多いときには1日で両子宮角合計で約0.5 ml と考えられている¹⁴³⁾。この様に子宮液が旺盛に分泌されることにより、精子の移動が容易となり、またその中に含まれる糖類、乳酸、遊離アミノ酸や脂質成分は精子の代謝基質として有効に作用するものと考えられている⁹¹⁾。この子宮液の分泌母地は子宮粘膜上皮細胞および子宮腺であり、Hamilton & Gould⁵⁷⁾ は発情期のイタチの子宮腺に多量の多糖類が存在することを報告し、Lovell & Getty⁹⁰⁾ は精子の存在した豚子宮腺にPAS 陽性反応を見だしている。

本研究では豚および家兎子宮腺腔への精子侵入と子宮腺分泌液との間で関連性を追究するために、豚子宮腺では糖質を、家兎子宮腺では糖質および脂質の分布を組織化学的に検索した。また、著者のこれまでの観察では子宮腺腔内精子と腺細胞が接触していることは少なかったが、Austin⁵⁾ はモルモット、Zamboni¹⁷⁰⁾ はマウスの子宮腺細胞の細胞質内に精子を確認して、この部位における精子の消化を示唆した。そこで細胞内消化に重要な意義を有する加水分解酵素の一つである酸性ホスファターゼ活性についても観察し、子宮腺腔が精子の消化吸收部位となり得るかを検討した。

2. 実験材料および方法

供試材料は、第3章、第2節で供試した豚6頭ならびに雄家兎2~3羽と交配後4, 10, 24, 48および72時間目に屠殺した家兎10羽の子宮角を採取し用いた。これら子宮角の固定液としては、豚の糖質の検出にはブアン液、家兎子宮角の糖質にはカルノア液または2%酢酸ナトリウム・10%ホルマリン液を用いた。脂質および酸性ホスファターゼ検出は家兎子宮角のみで行い、冷カルシウム・ホルマリン液で固定した。糖質の検出はエタノール脱水後、パラフィン包埋を施し、厚さ5 μm の連続切片100

枚を作製、また脂質ではクリオスタットにより厚さ約10 μm の凍結切片50枚を作製し、以下の組織化学的染色法⁸²⁾を実施し、反応部位および子宮腺腔内精子との関係を光学顕微鏡で観察した。

a) 多糖類染色法

過ヨウ素酸・シッフ法 (以下, PAS)

b) 多糖類の同定

マックマヌース・アセチル化法, 脱アセチル化法

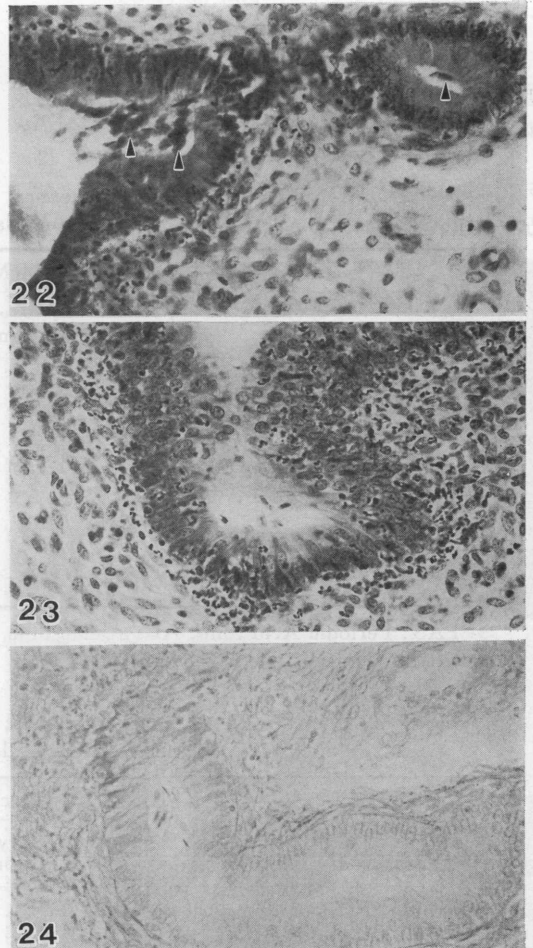


Plate 8. Identification of glycogen in a swine uterine glands, 7 hours after mating.

Fig. 22. Epithelium of the uterine gland with deep staining carbohydrates. Arrows indicates the spermatozoa. Periodic acid schiff (PAS) stain, $\times 230$.
Fig. 23. Uterine gland exhibited PAS negative. Uterine section stained with PAS after McManus acetylation procedure. $\times 230$.
Fig. 24. Uterine gland exhibited negative reaction. Alcian blue (pH 1.0) stain, $\times 230$.

- c) グリコーゲンの同定
ジアスターゼ消化試験
 - d) 酸性ムコ多糖染色法
pH 1.0 アルシアンブルー法 (以下, AB-pH 1.0)
pH 2.5 アルシアンブルー法 (以下, AB-pH 2.5)
 - e) 脂質染色法
ズダン・ブラック B 法
オイルレッド O 法
 - f) 酸性ホスファターゼの検出 (以下, ACP)
硝酸鉛 (Barka-Anderson) 法
- 組織化学的染色法による子宮粘膜上皮および子宮腺の反応結果は、その染色程度により強陽性 (++)、弱陽性反応 (+) および陰性 (−) の 3 種類に分類した。

3. 結 果

1) 豚子宮腺における糖質

豚子宮腺における糖質の検索結果は Table 11 に示した通りである。PAS 法については、交配後 7 時間および 26 時間 10 分に屠殺し、子宮腺腔内精子が観察された 2 頭で ++ の強陽性反応が観察された。しかし、精子の見られなかった他の 4 頭では PAS 陰性であった。PAS 反応は、特に子宮内膜機能層に分布する子宮腺細胞の頂端側に最も強く検出された (Fig. 22)。また、腺腔内の粘液にも強い陽性反応が見られ、精子は陽性反応を示す粘液に絡まるようにして子宮腺腔内に存在していた (Fig. 22)。しかし、これらの陽性反応は子宮内膜の基底深部に分布する子宮腺では弱く、精子も子宮腺深部にまで達し

Table 11. Histochemical localization of carbohydrate in the uterine glands of sows

Sow no.	Hrs. after mating	PAS ^{a)}	McManus+PAS ^{a)}		α -amylase digestion	AB ^{a)}	
			Acetylation	Deacetylation		pH 1.0	pH 2.5
1	7	++ ^{b)}	—	++	++	—	+
2	26 1/ 6	++	--	++	++	—	+
3	42 5/ 6	—	—	—	—	—	—
4	43 3/ 4	—	—	—	—	—	—
5	43 11/12	—	—	—	—	—	—
6	49 1/ 6	—	—	—	—	—	—

^{a)} PAS: Periodic Acid Shiff, AB: Alcian blue. ^{b)} Staining intensities: ++, positive; +, partially positive; —, negative.

Table 12. Histochemical localization of carbohydrate in the uterine glands of rabbits

Hrs. after mating	Rabbit no.	PAS ^{a)}	McManus+PAS ^{a)}		α -amylase digestion	AB ^{a)}	
			Acetylation	Deacetylation		pH 1.0	pH 2.5
4	1	++ ^{b)}	—	++	++	++	++
	2	++	—	++	++	++	++
10	1	++	—	++	++	++	++
	2	++	—	++	++	++	++
24	1	+	—	+	+	+	++
	2	+	—	+	+	+	++
48	1	—	—	—	—	+	++
	2	—	—	—	—	+	++
72	1	—	—	—	—	+	++
	2	—	—	—	—	—	+

^{a)} PAS: Periodic Acid Shiff. AB: Alcian blue. ^{b)} Staining intensities: ++, positive; +, partially positive; —, negative.

ていなかった。検出された PAS 法陽性反応が多糖類によるものであることを確認するため、マックマヌース・アセチル化法を行ったところ PAS 法の陽性部位は陰性となり (Fig. 23)、このアセチル化を施した切片を脱アセチル化試薬に入れ PAS 法を行ったところ、陽性反応 (++) は復活した。ジアスターゼ消化後の PAS 法におい

ては陽性のままであった。従って、子宮腺細胞ならびに腺腔内の PAS 陽性物質は、ジアスターゼに消化されにくい多糖類と考えられた。

一方、豚子宮腺における酸性ムコ多糖は、AB-pH 1.0 法では検出されなかったが (Figs. 24 および 25)、AB-pH 2.5 法では+の陽性反応が子宮腺細胞頂端側に沿って観察され、更に子宮腺腔内精子の観察された子宮腺に比較的強く検出される傾向が見られた (Fig. 26)。これらの陽性反応は屠殺時にすでに排卵し、子宮腺腔内精子の観察されなかった4頭の子宮腺においては極めて弱いか、検出されなかった (Fig. 27)。

これら PAS ならびに AB 法の反応は子宮の上部、中央部および下部の3部位間で差は認められなかった。

2) 家兎子宮腺における糖質

家兎子宮腺における糖質の検出結果は Table 12 に示した通りである。家兎における PAS 法陽性反応は交配

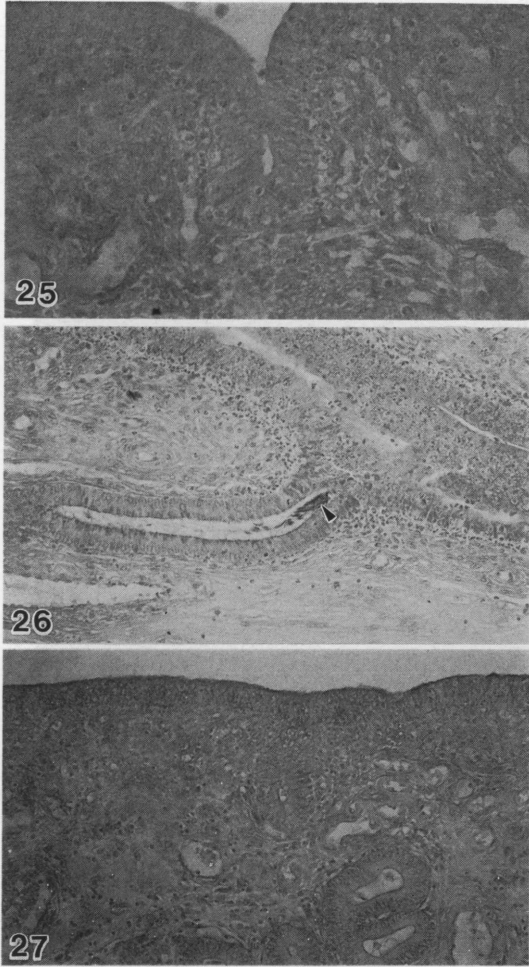


Plate 9. Identification of acid mucopolysaccharides in the swine uterine glands.

Fig. 25. The uterine gland exhibited negative reactions, 43 11/12 hours after mating. Alcian blue (AB)-pH 1.0 stain. $\times 240$.

Fig. 26. The uterine gland with weakly staining acid mucopolysaccharides, 7 hours after mating. Arrow indicates the spermatozoa. AB-pH 2.5 stain. $\times 120$.

Fig. 27. The uterine gland exhibited negative reactions, examined 43 11/12 hours after mating. AB-pH 2.5 stain. $\times 240$.

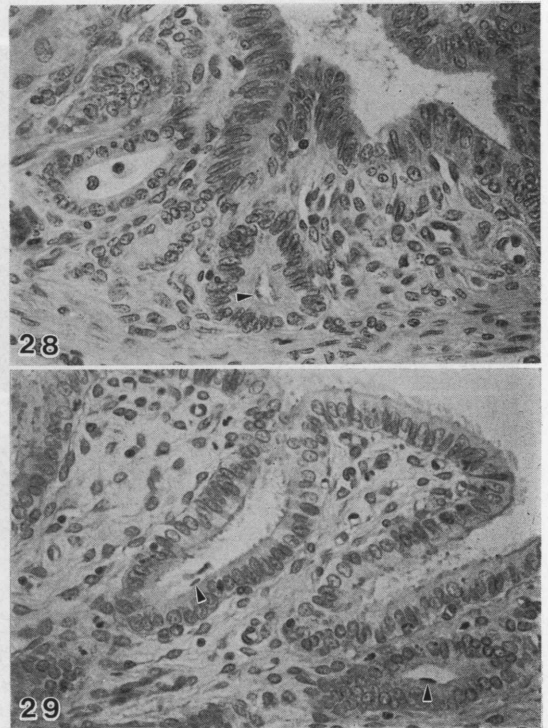


Plate 10. Identification of glycogen in the rabbit uterine glands. Arrows indicates the spermatozoa.

Fig. 28. The uterine glands examined 4 hours after mating. Mucus in the glandular lumen with deep staining glycogen. Periodic acid Schiff (PAS) stain. $\times 320$.

Fig. 29. The uterine gland examined 24 hours after mating. PAS stain. $\times 320$.

後4時間ならびに10時間目の子宮腺頂端側および腺腔内粘液に淡赤色から深赤色(++)として観察された。しかし、家兎子宮腺における反応は、豚とは異なりPAS法陽性を示す子宮腺の数は少なく、また一般に腺開口部からやや腺底部方向に入った部位に検出された(Fig. 28)。子宮腺腔内精子は、これらPAS法陽性を示す子宮腺に

多く、陰性の子宮腺では殆ど観察されなかった。

子宮腺における陽性反応は交配後の時間経過に伴い低下傾向を示し(Fig. 29)、72時間目では陰性であった。

マックマヌース・アセチル化法を行った後のPAS法では、PAS法陰性となり、ついで脱アセチル法では、再度PAS法陽性を示した。しかしジアスターゼ消化を

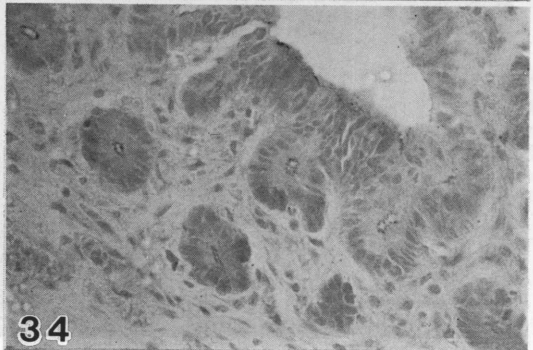
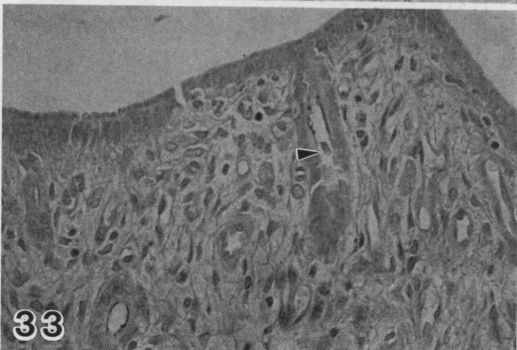
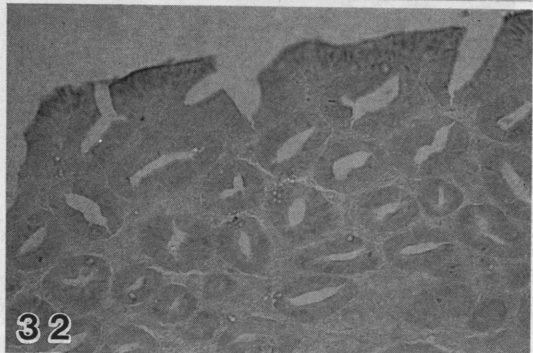
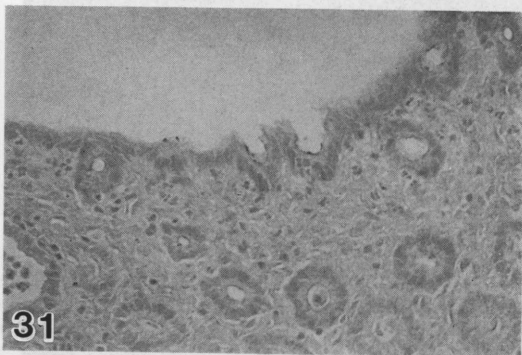
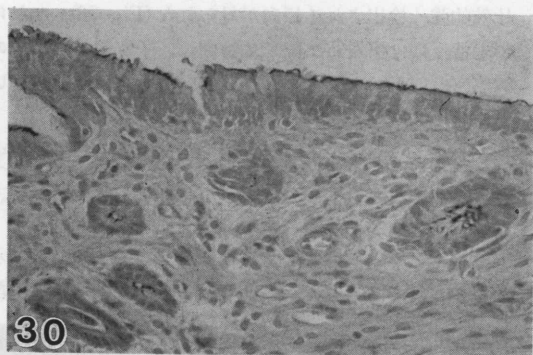


Plate 11. Identification of acid mucopolysaccharides in the rabbit uterine glands.

Fig. 30. The uterine glands examined 4 hours after mating. The glandular lumen with deeply staining acid mucopolysaccharides. Alcian blue (AB)-pH 1.0 stain. $\times 280$.

Fig. 31. The uterine glands examined 10 hours after mating. AB-pH 1.0 stain. $\times 280$.

Fig. 32. The uterine glands examined 72 hours after mating. AB-pH 1.0 stain. $\times 280$.

Fig. 33. The uterine glands examined 4 hours after mating. The surface of glandular epithelia with staining acid mucopolysaccharides. Arrow indicates the spermatozoon. AB-pH 2.5 stain. $\times 280$.

Fig. 34. The uterine glands examined 48 hours after mating. AB-pH 2.5 stain. $\times 280$.

行った後の PAS 法では反応性は低下しなかった。

AB-pH 1.0 ならびに AB-pH 2.5 による酸性ムコ多糖類検出部位は PAS 法と類似し、主に子宮腺細胞の頂端側に青色の反応として検出された (Figs. 30~34)。し

かし、AB-pH 1.0 の染色性は交配後の時間経過にともないやや低下し、また陽性反応を示す子宮腺数も減少する傾向が見られた (Fig. 32)。AB-pH 2.5 では交配後 72 時間目においても++の陽性反応を示す家兎が存在し、

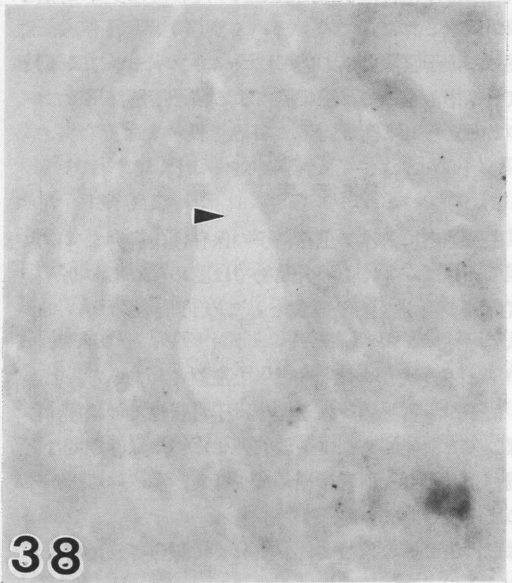
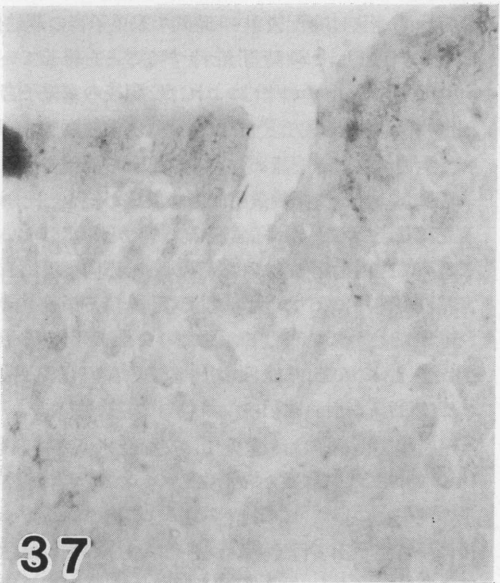
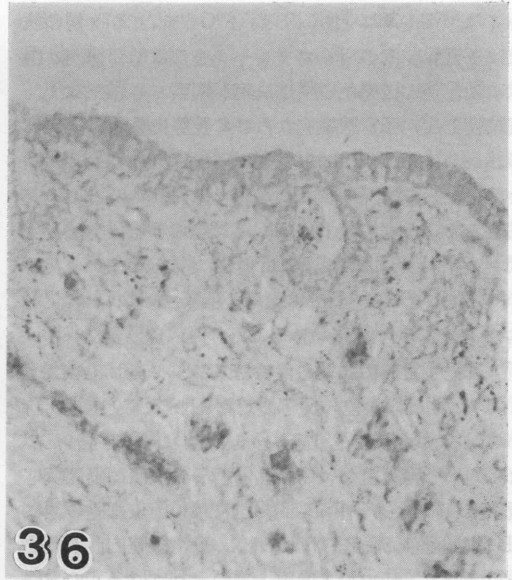
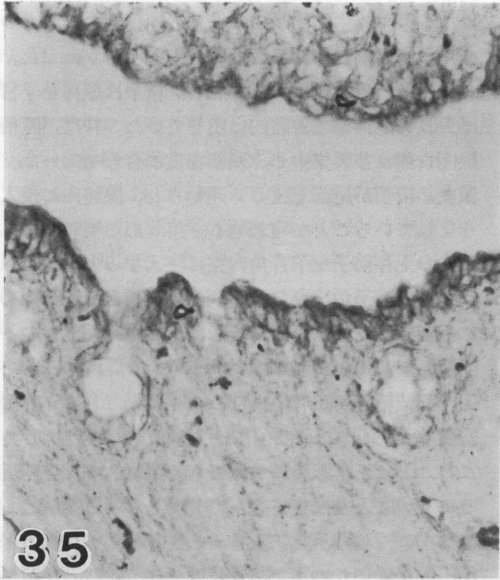


Plate 12.

Figs. 35 and 36. Identification of lipids in the rabbit uterine glands, 10 hours after mating.

Fig. 35. Glandular epithelia with faint staining lipids. Sudan black B stain. $\times 260$.

Fig. 36. The uterine gland exhibited negative reaction. Oil red O stain. $\times 260$.

Figs. 37 and 38. Identification of acid phosphatase in the rabbit uterine glands, 24 hours after mating.

Endometrium and epithelial cells with weakly staining acid phosphatase (Fig. 37.), while spermatozoon (arrow) in the glandular lumen exhibited negative reaction (Fig. 38). Barka-Anderson's stain. $\times 260$.

子宮腺腔内精子は、概ね+〜++陽性反応を示す子宮腺に多く観察された。

3) 家兎子宮腺における脂質

ズダンラック B 法では、脂質は主に子宮粘膜上皮に黒色の反応として観察されたが、子宮腺では反応は見られなかった (Fig. 35)。オイルレッド O 法による脂質の検索では子宮腺腔内のマクロファージまたは結合織内の白血球に顆粒状の橙赤色の陽性反応が観察されただけで、子宮粘膜上皮、子宮腺細胞ならびに腺腔内粘液に反応は見られなかった (Fig. 36)。従って、子宮腺における脂質と精子侵入の関係は少ないものと思われた。この子宮腺細胞および子宮内膜上皮細胞における反応は交配後 4 時間および 10 時間では顕著な変化は見られなかったが 24, 48 および 72 時間目では反応が低下する傾向が見られた。

4) 家兎子宮腺における酸性ホスファターゼ (ACP)

ACP 活性は濃褐色の反応沈着物として、交配後 4 時間から 72 時間目の子宮粘膜上皮細胞に検出されたが (Fig. 37)、子宮腺腔および腺腔内精子の周囲に陽性反応は観察されなかった (Fig. 38)。子宮粘膜上皮細胞の他に ACP 陽性反応が検出されたのは、子宮腺腔内マクロファージであり、特に子宮内膜上皮のそれには多くの陽性顆粒が観察された。

従って、子宮腺腔においてはマクロファージによる精子貪食はあるものの、腺細胞による精子溶解作用はないものと考えられる。

第 6 節 考 察

雌生殖道内における生存精子の保存は、排卵までの短時間であれば、多くの哺乳動物では認められており¹⁴⁷⁾、子宮腺腔が精子の保存部位としての可能性はモルモット⁵⁾、犬³⁶⁾、綿羊¹⁴⁸⁾、豚⁹⁰⁾、コウモリ¹²³⁾、マウス¹⁷⁰⁾、牛¹⁴⁹⁾、野兎⁹³⁾、カンガル¹⁵¹⁾で推測されている。しかし、精子が子宮腺腔へ入る機序、子宮腺腔での状態、子宮腺腔での機能的または生理的变化、更に保存期間などを調べようとした研究は極めて少なく、多くのことが不明のまま残されている。

本章、第 2 節の結果では、これまで報告されていなかった家兎で子宮腺腔内精子を確認し、また、牛、豚においてもそれを再確認した。家兎精子の子宮腺腔内侵入は交配後 2 時間以内に起きており、子宮腺深部まで達し、少なくとも 48 時間目までは観察できることが明らかとなった。Overstreet & Cooper¹¹⁵⁾によれば家兎子宮内精子数は交配後 1.5 時間で急激に増加し、精子運動性もこの時が他の時期よりも活発である。この時間帯は子宮

腺腔内精子が観察された時期とほぼ一致し、交配後、子宮内に入ってきた精子の一部は、直ちに子宮腺腔内にも侵入してきていることを示している。

その子宮腺腔内精子は、精子自身の運動性による侵入と子宮の収縮運動の影響が考えられる。本章の実験結果は、子宮腺腔内精子が主に精子の運動性によるものであり、子宮収縮の影響が少ないことを明らかにした。すなわち、第 2 節の SEM 観察では、精子は頭部を子宮腺腔に入れ、尾部を子宮腔内に出していた。特に、豚精子は腺開口部に多数集中し、頭部を重ね合わせていた。この像は、精子が尾部を激しく運動させ、腺腔内に侵入しようとしていることを窺わせる。第 3 節の実験では、家兎と牛の生存精子を子宮角内腔に注入すると、子宮腺腔内に多数の精子が出現したが、死滅精子を注入した場合には子宮腺腔内の精子数が極端に少なかった。このことに関連して、Mattner & Braden⁹⁷⁾は、腔内に注入された山羊死滅精子が頸管中央部にのみ限局されて存在し、頸管腺 (cervical glands) には入らないと報告している。このことは子宮腺腔においても、運動性のない精子は入りにくいことを推察させる。しかし、両端を結紮した子宮角内に死滅精子を注入すると、無結紮に比較し腺腔内精子数が増加し、また、長時間存在することが観察された。Fuchs⁴⁷⁾は交配後 1〜3 時間で家兎子宮の運動性が顕著に増加し、24 時間維持することを報じている。Suzuki & Tsutsumi¹⁴⁶⁾によれば交配後の家兎子宮の収縮振幅は 36 時間まで変化しないが、収縮頻度は 6〜12 時間で急増することを認めている。これらの報告は、家兎子宮においては交配後数時間強い収縮が続き、それにより死滅精子でも少しは子宮腺腔に入ることを示している。しかし、腔内射精動物では頸管から腔方向へ流出する子宮粘液の作用により、大多数の死滅精子が腔へ排出される⁴⁷⁾とされているので、通常の交配で死滅精子が、子宮腺腔に入る可能性は極めて少ないものと考えられる。

子宮腺腔内精子は、家兎では交配後 96 時間、豚では約 43 時間で子宮腺腔から消失していた。子宮腺腔内精子の消失については、i) 精子が子宮腔内に一時留まった後に子宮腔へ出て行く、ii) マクロファージまたは白血球による精子貪食、iii) 子宮腺細胞による消化等が考えられる。子宮腺腔内精子を示した報告は多いが、子宮腺腔から出るところを示したのは皆無である。本実験においても、精子が出て行くのを直接観察することはできなかったが、しかし家兎、豚および牛の子宮腺腔内精子がしばしば子宮腺開口部方向に頭部を向けているのを確認した。このことは子宮腔へ、精子自らの運動性により出て

行く可能性の強いことを示唆している。一方, Austin⁵⁾ はコウモリの子宮の組織学的観察から, 精子は子宮腺腔で溶解すると考え, またモルモットおよびマウスでは子宮腺腔内に精子を含んだ白血球が多数存在することから, これら細胞による精子処理を推察した。これに対し Zamboni¹⁶⁹⁾ はマウス子宮を透過型電子顕微鏡で観察し, 精子は子宮腔では子宮粘膜上皮細胞に貪食されるが, 子宮腺腔では腺細胞表面に付着しているだけで, 細胞内に取り込まれていないことを示し, 子宮腺細胞による精子の取り込みは極めて稀であると報告した。本実験ではマクロファージまたは白血球による子宮腺腔内精子の貪食率は, 家兎では 0.7~26.7%, 豚では 0~0.9%, 牛では 0~0.4% と低値であった。従って, 子宮腺腔内精子の全てが, これら遊走細胞の食作用のみで消失するとは考え難い。更に, 子宮腺細胞による精子取り込みまたは腺腔における精子溶解については, 光学顕微鏡で観察した限り, 腺細胞内に精子が取り込まれている像は観察されなかった。また, 腺腔内精子の形態は正常で, 精子崩壊像または染色異常は認められなかった。

子宮腺において精子消化の少ないことは, 酸性ホスファターゼ (以下, ACP) 活性の観察結果からも窺うことができる。子宮腺腔における ACP 活性については, 豚で妊娠 30 日から 58 日にかけて増加すると報告されている¹³⁸⁾。しかし, 子宮腺腔または腺細胞における精子消化と ACP 活性との関連については報告されていない。Koyama⁸⁶⁾ はラット精巣輸卵管上皮細胞における精子取り込み像を電子顕微鏡で観察し, 上皮細胞に取り込まれ, 崩壊像を呈し, 消化過程にある精子の周囲には ACP 活性に基づく電子密度の高い顆粒状物が観察されたと報じている。このことは子宮腺においても精子消化が発現すれば精子周囲に ACP 反応が出現するであろうことを示唆している。しかし, 本実験の組織化学的観察では, 子宮腺腔内精子の周囲に ACP 反応は検出されなかった。従って, この部位における精子の溶解は極めて稀な現象であると考えられる。以上のことは, 子宮腺の精子保存部位としての機能を支持するものであり, 精子処理機構としての機能は少ないことを示している。

子宮腺が精子保存部位として機能するための条件には, 前述の精子の取り込みまたは溶解が無いこと, 更に, 精子が保有する内在基質は限られているので⁹²⁾, 精子の代謝がある程度抑制される一方で, 代謝基質が供給されることなどが考えられる。精子代謝の抑制は, 家兎では子宮腺腔が狭くなっており, 豚では家兎よりも広いが, 精子は子宮腺分泌液に絡まっていたことから精子の運動性はかなり抑制されるものと推察される。精子が利用で

きる体外基質として糖, 脂肪酸, アミノ酸, 多価アルコールなどが知られている¹⁶⁷⁾ が, 子宮腺では糖に関する報告が多く, 人子宮腺は月経周期に伴い変化し, 最初に PAS 陽性でジアスターゼに消化されるグリコーゲンが多く, 中期には PAS 陽性, ジアスターゼ未消化の糖質が増加するといわれ¹⁶²⁾, また, 酸性ムコ多糖類も子宮内膜に検出されている。コウモリの子宮では, 精子が頭部を PAS 陽性の子宮腺に向けているのが確認されている¹²⁷⁾。本章第 5 節の実験では, 家兎および豚の子宮腺腔と腺細胞頂端側に PAS 陽性, ジアスターゼ未消化糖質ならびに AB-pH 1.0 または AB-pH 2.5 に反応する酸性ムコ多糖類が検出された。これらの反応は交配直後に強く, 時間経過にともない漸減する傾向が見られた。更に, Gregoire & Guinness⁵³⁾ はイタチの子宮のグリコーゲン量は性周期の第 1 日目に強く, その後減少すると報告し, 糖質の性周期に伴う変動を認めている。従って, 子宮内に上向してきた精子の一部は, 分泌液に含まれるこれら糖質に走性を示して子宮腺に入り, 腺腔内では基質として代謝に利用しているものと推察される。

Doak *et al.*³⁶⁾ は犬子宮腺腔内精子の消失は子宮腺内滞留時間と関連なく, 発情後期の開始と関連あることを示唆した。すなわち, 子宮腔内精子が移動した後, 子宮腺腔内精子が出て補充されるものと考えた。本章第 1 節の豚子宮角において, 子宮腺腔内精子が排卵前の個体においてのみ観察された。このことは子宮腺腔内精子の消失と排卵現象とが関連あることを推察させる。また, 第 4 章の結果では, hCG 投与を遅延させたとき, 子宮腺腔内精子は精液注入後 5 日まで観察された。これに対し, 精液注入と同時に hCG を投与するとわずか 1 日で消失していた。更に, インドメサシン投与によって排卵を抑制しても卵胞細胞の黄体化により, 排卵を誘起したときと同様に子宮腺腔内精子が観察される時間は短くなった。このことは排卵までの時間が長くなると, 精子は子宮腺腔に長時間存在するようになることを示している。この子宮腺腔内精子が受精能を有していることを確認するのは困難で, これを直接証明した報告は皆無である。

一方, 第 4 節の精液注入後一定時間をおいた後, 排卵を誘起した実験では, 注入後 4 日目まで極体 2 個を有する卵を得ることができた。もし, これらの卵が受精卵と仮定したとしても, この受精に関与した精子がどの部位に保存されていたものかは全く不明である。しかし, 子宮腺腔内精子が子宮腔に移動し, 更に, 受精に関与したと断言することは危険ではあるが, その可能性を全く否定することもできないものとする。

第4章 家兎精子における精漿成分の消長

第1節 ま え が き

Austin³⁾ と Chang²¹⁾ は、家兎精子が受精前に受精能力を獲得するため、発情雌生殖道内に数時間貯留する必要があることを示し、Austin⁴⁾ はこの現象を受精能獲得 (capacitation) と名付けた。その後の究研により受精能獲得はラット、ハムスターをはじめ多くの哺乳動物に確認されている。受精能獲得現象は発情雌の生殖道内で見られるが、家兎のように腔内に射精する動物では、子宮と卵管の環境に連続的に接触することにより最も効果的に完了するようである⁸⁾。これらの部位で受精能獲得を直接制御している因子が何であるかは不明であるが、可能性のある物質として β -amylase と β -glucuronidase⁵⁵⁾, carbonic anhydrase²⁸⁾, taurine hypotaurine⁹⁹⁾, catecholamine⁵⁹⁾, arylsulfatase, fucosidase と acetylhexosaminidase^{123,130)}, glycosaminoglycans⁵⁸⁾, proteinase と neuraminidase¹³⁶⁾ および steroid sulfatase^{87,88)} があげられている。

一方、受精能獲得は、家兎精子では精漿または精巢上体液により抑制されることが Chang²³⁾ により明らかにされ、受精能破壊因子 (Decapacitation factor) と名付けられた。この因子は糖タンパク質から成り、精子頭部にシアル酸により結合されていることが考えられた²⁴⁾。

その後の研究により、雌生殖道内に射精された精子の最外層は糖タンパク質や糖脂質の被膜で覆われており、射精後の外部環境の激変から精子を保護し、細胞膜の安定化に寄与していると考えられている。これらの被覆物質は精子が精巢上体内で成熟してゆく過程で吸着または結合され、更に射精時には副生殖腺からの分泌液と混合するときにも被覆されるものとされている。特に、精漿に起因する物質の被覆は精巢上体に起因する物質よりも安定性が高いといわれている¹³⁴⁾。この被覆物質の一部は精子被覆抗原 (以下、SCA) と呼ばれ、モルモット、ラット、マウス、豚および家兎で報告されている。Weil & Rodenburg¹⁶⁰⁾ は免疫蛍光抗体法による観察で射出精子表面に薄膜状に存在することを示し、Hunter & Nornes⁶⁵⁾ は家兎精漿から受精を抑制する SCA を分離した。これらの報告は SCA が受精能獲得と関わっており、雌生殖道内で精子から除去されることを示している。このように精子表面からの被覆物質の除去が、受精能獲得の重要な部分を構成しているという見解を支持する報告は多く見られる^{26,83,84,112,121,161)}。Volgmayr & Sawyer¹⁵⁶⁾ は、綿羊の射出精子を子宮液とともに保存す

ると精子から3種類の Glycosylated protein (65, 41 および 24 Kilodalton) が遊離し、卵管液では2種類 (97 および 41 Kilodalton) が遊離すると報告している。Yanagimachi¹⁶⁶⁾ は、このようなタンパク質は精子膜と電気的關係で結合しているので、キレート化合物を加えたりまたは pH やイオン強度を変えることにより、遊離させることができるものと推察している。

一方、第3章では子宮腺への精子侵入の主な機構として、活発な精子運動性および子宮腺分泌液に対する走性が考えられ、また子宮腺腔内精子の滞留時間が排卵現象と密接に関連していることが明らかに示された。しかし、子宮腺腔に滞留している間に精子にどのような変化が起きているのかは全く不明である。Ullmann¹⁵²⁾ はマウス子宮腺腔に精子が交配後15日間も存在していたのを確認し、マウス異期複妊産の生起にこの子宮腺腔内精子が関与しているものと推察しており、更に精子が長時間生存できる機構の一つとして、精子の受精能獲得の遅延を挙げている。しかし、子宮腺腔内精子の受精能獲得について検討した報告は全く見当らず、子宮腺腔への精子侵入の意義を明らかにするためにも、腺腔内精子の受精能獲得の状態について把握しておく必要がある。受精能を確認するには直接精子と卵子を会合させるのが良いが、子宮腺腔内精子については実験困難である。従って、前述の免疫蛍光抗体法による精子 SCA を観察するのが応用し得る最も可能性ある方法と思われる。

この精子 SCA の観察には精漿成分を抗原とする抗体を作製し、間接蛍光抗体法で観察する方法が用いられ、特に人、豚および家兎精子では精子先体で反応が強く、尾部で弱いといわれている。もし、子宮腺腔内で SCA が除去されるならば、子宮腺細胞に精漿成分を吸収する能力もあると考えられる。従って、子宮腺腔の SCA の消長を観察すると同時に、子宮腺細胞、更に雌生殖道内膜上皮における精漿成分の消長を観察し、確認しておく必要がある。

他方、家兎精漿に含まれる SCA を電気泳動法またはゲルクロマトグラフィーにより検討した報告がいくつか見られる。Hunter & Nornes⁶⁵⁾ は、SCA は分子量約170,000の糖タンパク質で105,000 g の遠心分離により沈殿すると報告した。また、Eng & Oliphant³⁸⁾ は家兎精漿から *in vivo* で可逆的に受精を抑制し、先体反応を阻止する物質を精製し、先体安定化因子 (ASF) と名付け、その分子量はカラムクロマトグラフィーで355,000、ポリアクリルアミド・ディスクゲル電気泳動法で、370,000 と報告している。この ASF が家兎では受精能獲得と最も関連ある物質であろうと考えられている。しかし、Müller

& Kirchner¹⁰⁷⁾は家兎精漿に酸性の糖タンパク質が含まれているのを見だして、SCA との関連は不明であるが、ゲル電気泳動法により分子量は29,000と報告している。同様に電気泳動による家兎精子膜の蛋白質分画は分子量35,000, 39,000, 50,000, 78,000, 86,000の5分画であることも知られている¹⁴⁴⁾。この様に受精能獲得と関連した精漿成分は実験方法により相違するので、精漿由来の精子被覆抗原についてもゲル電気泳動またはクロマトグラフィーにより検討する必要があると考える。

従って、本章ではまず免疫蛍光抗体法を用い、交配後の家兎生殖道内における精漿成分の分布および子宮腔内精子におけるSCAの消長を詳細に観察し、ついで子宮腺腔内精子のSCAの観察を実施し、SCAが子宮腺腔で除去されるか否かを検討しようとした。また、ゲル電気泳動法ならびにゲルクロマトグラフィー法により家兎精漿タンパク質の特性とSCAとの関連をも検討した。

第2節 雌家兎生殖道および子宮腺腔内精子における精漿成分の消長

1. 目 的

第3章の結果は、子宮腺腔が精子保存部位となる可能性を強く示唆している。もし、子宮腺が精子保存部位となるならば、腺腔内における精子の機能的または生理学的変化を追究し、精子侵入の意義を明らかにする必要がある。

一方、子宮内で起こる精子の機能的または生理学的変化として受精能獲得がある。これは精巣上体および精漿との接触により被覆した精子膜表面の被覆物質の除去または変化であり、精子膜の感受性を高め卵子を認識するようになることである¹⁶⁶⁾。この被覆物質の一部である

SCAは、通常の食塩水による洗浄の反復では、精子の表面から除去することはできないが、家兎子宮および卵管の粘液中では容易に除去されることが知られている¹³⁴⁾。しかし、雌生殖道内、特に子宮腺におけるSCAの分布を観察した報告は見当たらない。そこで雌生殖道内における交配後の精漿成分の分布とその消長を知ろうとして、凍結切片を作製し、抗精漿血清を用いた間接蛍光抗体法を実施し、雌生殖道内の部位別ならびに交配後の経過時間別に比較検討した。

2. 実験材料および方法

抗精漿血清は次に示す方法により作製した抗家兎精漿ラット血清を用いた。まず、人工腔法により、雄家兎10羽から精液を採取し、直ちに室温で3,000 rpm, 15分間の遠心分離を行い上清を得、更に5℃で11,000 rpm, 30分間の遠心分離を実施し、得られた精漿を抗原とした。抗原は-20℃で凍結保存した。この抗原を使用時に溶解し、等量の Freund's complete adjuvant と混合、未經産ラットの皮内に1週間間隔で3回反復投与した。最終投与後1週間目に全採血し、血清を分離した。抗精漿血清は56℃で30分間加温して非働化処理を行った後、抗体価をオクテロニー法による免疫二重拡散法で測定した。

雌生殖道の間接蛍光抗体法による免疫組織化学標本の作製は、まず雌家兎35羽を用い、交配後hCG 20 IUを投与、交配直後(交配後20分以内)ならびに交配後4, 8, 10, 12, 24 および48時間目に屠殺、屠殺後直ちに全生殖器官を摘出し、液体窒素ガスで凍結固定した。固定後の生殖器は腔、子宮頸、子宮下部、子宮上部、卵管峡部(子宮端から3 cmの部位) および卵管膨大部(卵管采から2.5 cmの部位)の6部位に分離し、厚さ10 μmのクリオス

Table 13. Immunohistochemical localization of seminal plasma component in luminal and glandular epithelia of rabbit genital tract after mating^{a)}

Hrs. after mating	Vagina	Cervix	Uterine horn		Isthmus	Ampulla
			Lower	Upper		
0 ^{b)}	+ ^{c)}	±	±	±	--±	--±
4	+	+	+	+	--±	--±
10	+	±	+	+	+	+
12	+	±	+	+	±	-
24	±	±	--±	±+	+	--±
48	±	--±	-	-	-	±

^{a)} Genital tract was observed using an indirect immunofluorescence staining technique with anti-rabbit seminal plasma rat sera FITC conjugated anti-rat IgG rabbit sera. ^{b)} Five does were examined each hour after mating. ^{c)} +, bright fluorescence; +, partial or weak fluorescence; -, none.

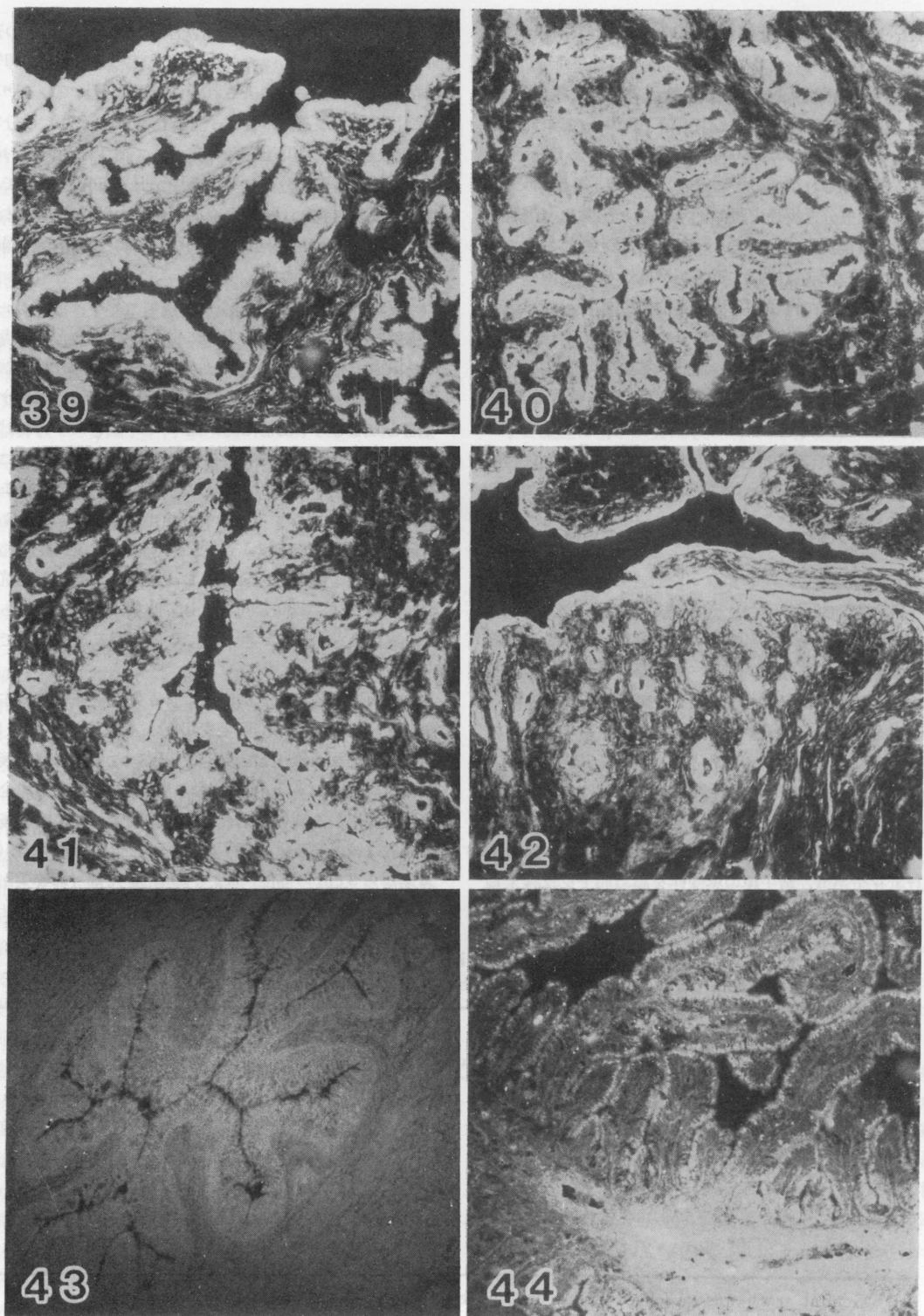


Plate 13. Indirect immunofluorescence staining of rabbit genital tract epithelia using anti-rabbit seminal plasma rat serum and fluorescein-isothiocyanate conjugated anti-rat IgG rabbit serum (Figs. 39-50).

Fig. 39. Vagina, 4 hours after mating. $\times 90$.

Fig. 40. Cervix, 4 hours after mating. $\times 90$.

Fig. 41. Lower part of uterus, 4 hours after mating. $\times 90$.

Fig. 42. Upper part of uterus, 4 hours after mating. $\times 90$.

Fig. 43. Isthmus, 4 hours after mating. $\times 90$.

Fig. 44. Ampulla, 4 hours after mating. $\times 90$.

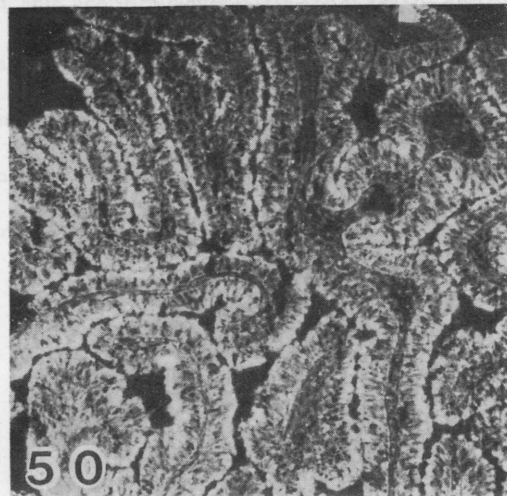
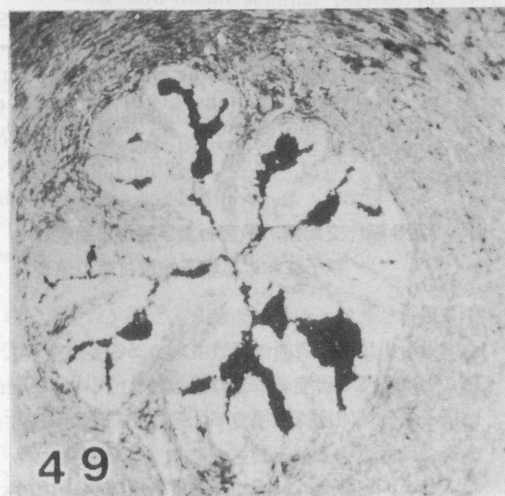
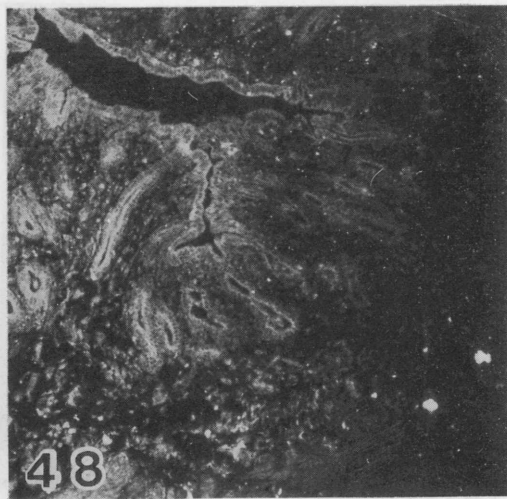
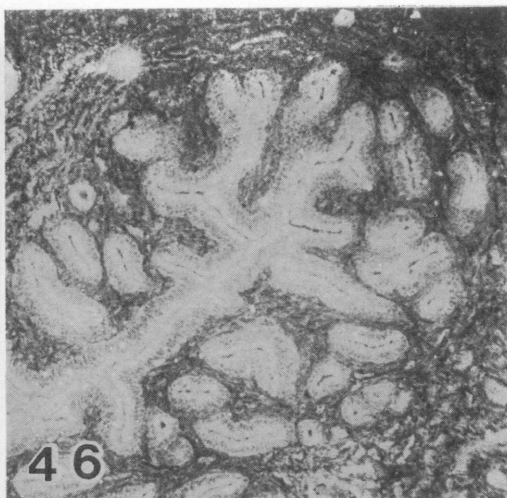
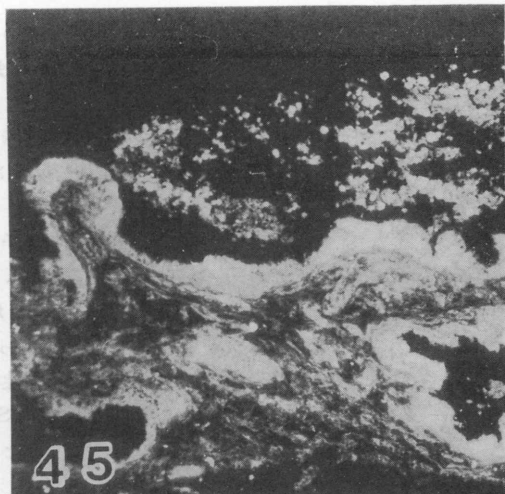


Fig. 45. Vagina, 48 hours after mating. $\times 90$.
 Fig. 46. Cervix, 48 hours after mating. $\times 90$.
 Fig. 47. Lower part of uterus, 48 hours after mating. $\times 90$.

Fig. 48. Upper part of uterus, 48 hours after mating. $\times 90$.
 Fig. 49. Isthmus, 48 hours after mating. $\times 90$.
 Fig. 50. Ampulla, 48 hours after mating. $\times 90$.

タット切片を作製，無蛍光スライドガラスに接着し，4°Cのアセトンに10分間浸漬固定した。その後 Shulman¹³⁷⁾の方法に準じて，第一抗体に PBS で10倍希釈した抗精漿血清，第二抗体に PBS で30倍希釈した Fluorescein isothiocyanate 結合抗ラットIgG 家兎血清 (ICN Imuno Biologicals) を用い，各 37°C，湿室，60分間の反応後，蛍光顕微鏡 (オリンパス) に励起フィルター BG12，吸収フィルター O-515 を装着して観察した。

雌生殖道の蛍光反応はその強さの程度により + (強陽性反応)，± (微弱陽性反応) および - (陰性) の3段階に分類し観察した。

また，交配後 4~24 時間目の子宮腺腔に精子が観察され，精子頭部の先体に蛍光反応が見られた (Figs. 51~54) ので子宮腺腔内精子における SCA の消長を観察するため，子宮角上部および下部のクリオスタット切片各12枚，計 24 枚に観察された子宮腺腔内精子の蛍光反応率を求めた。

3. 結 果

1) 雌家兎生殖道における精漿成分の消長

雌生殖道 6 部位における精漿成分の分布状態および時間経過に伴う消長は Table 13 に示した通りである。

蛍光反応は，一般に生殖道の粘膜上皮および子宮腺細胞に観察された。これらの反応は交配直後では腔のみに + の強い反応が見られたが，交配後の時間経過に伴い子宮頸から子宮上部，更に卵管へと拡散した。すなわち，4 時間目では腔から子宮上部にかけて + の反応が観察され (Figs. 39~42)，子宮上部では子宮内膜表面および子宮腺において明瞭であった。しかし，卵管峽部および卵管膨大部は±の弱い反応であった (Figs. 43 および 44)。ついで 8 時間目では更に卵管膨大部にまで達し，精漿成分は交配後 8 時間で，ほぼ雌生殖道内全体に分布していることが窺われた。しかし，これらの反応は 12 時間目以降，時間の経過とともに減弱し，48 時間目では腔と卵管峽部以外は蛍光反応が減弱または陰性を示した (Figs. 45~50)。

これらの蛍光反応が家兎精漿に対し特異的であることを検定するため，第一抗体に抗精漿血清の代わりに PBS または精漿で吸収した精漿吸収抗血清を用いて，間接蛍光抗体法を実施した。その結果，前述の蛍光反応は見られず，雌生殖道における陽性反応は家兎精漿に対して特異的であることが確認された。

2) 子宮腺腔内精子の蛍光反応

交配後 4~24 時間目に観察された子宮腺腔内精子数は供試家兎により変動したが，8~198 個を数え，交配後の時間経過に伴い増加する傾向が見られた。これらの精子

の蛍光反応は Figs. 51~54 に示すように，頭部の先体で強く，後帽は弱く，両者の境界は明瞭であった。また，尾部における蛍光反応は極めて弱いものであった。このことは SCA が先体に集中して存在することを示している。子宮腺腔内精子の SCA に対する蛍光反応率は Table 14 に示した通りである。

すなわち，先体に蛍光反応のない SCA 消失精子は時間経過にともない漸増傾向を示し，4 時間目 25.4%，12 時間目 43.2% の値を示した。しかし，24 時間目では増加したものの 65.2% であり急激な変化は見られなかった。

一方，子宮腺腔内精子における蛍光反応の特異性検定を前述の方法に基づいて行ったが，第 1 抗体に PBS，第 2 抗体に抗原の精漿で吸収した抗血清を用いたときには，蛍光反応は観察されなかった。

これらのことは，SCA が子宮腺腔内においても交配後時間経過にともない除去または変化することを示している。しかし，蛍光反応消失精子の割合は低く，特定の時間帯で SCA 除去または変化が特に進行することはないように思われた。

Table 14. Loss of SCA^{a)} from the rabbit uterine glandular spermatozoa

Hrs. after mating	Immunofluorescence staining intensity (Mean ± S.E.) ^{b)}		
	+ ^{c)}	± ^{c)}	- ^{c)}
	%	%	%
4	32.7 ± 11.1	42.2 ± 2.0	25.4 ± 12.8
8	38.2 ± 21.9	35.9 ± 28.4	30.1 ± 10.3
12	36.4 ± 23.6	20.4 ± 19.0	43.2 ± 18.9
24	12.7 ± 6.6	22.1 ± 6.5	65.2 ± 9.4

a) SCA: Spermatozoa coating antigens. b) Counts from 20 cryostat sections of 10-μm thickness. c) +, bright fluorescence; ±, partial or weak fluorescence; -, none.

第 3 節 交配後，子宮および腔から回収した精子における精子被覆抗原の消長

1. 目 的

家兎射出精子の表面に精漿由来の SCA が被覆していることは多くの研究者により報告されているが，Metz¹⁰¹⁾は精子の受精能獲得過程で SCA の一部または全てが除去または変化する可能性のあることを示唆した。Oliphant & Brackett¹¹⁰⁾は家兎射出精子を子宮内で培養すると抗精漿血清による精子の頭部凝集能が低下することを見だし，精子の受精能獲得は SCA の除去を含

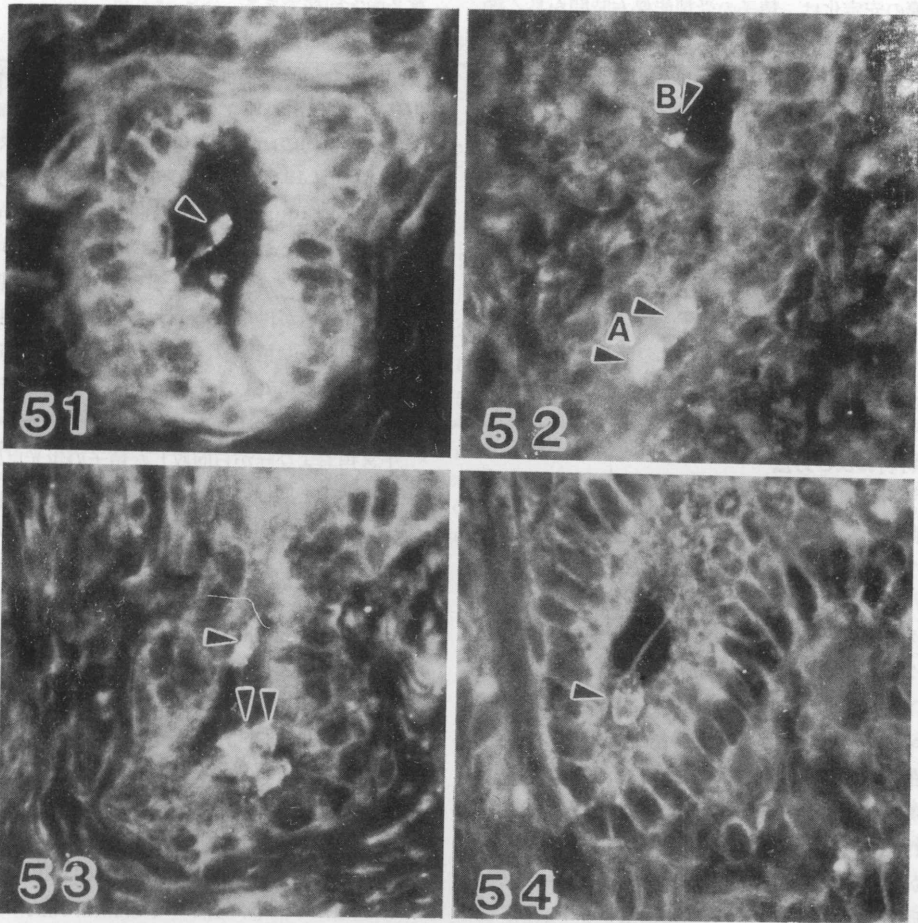


Plate 14. Indirect immunofluorescence staining of rabbit uterine glandular spermatozoa using anti-rabbit seminal plasma rat serum and fluorescein-isothiocyanate conjugated anti-rat IgG rabbit serum.

Fig. 51. Glandular spermatozoa, 4 hours after mating. Note bright fluorescence on the acrosomal cap. $\times 470$.

Fig. 52. Glandular spermatozoa, 8 hours after mating. Note spermatozoa (A) with fluorescence and spermatozoa (B) show absence of fluorescence on the acrosomal cap. $\times 470$.

Fig. 53. Glandular spermatozoa, 12 hours after mating. All spermatozoa with bright fluorescence on the acrosomal cap (arrow). $\times 470$.

Fig. 54. Glandular spermatozoa, 48 hours after mating. Note the slight reduction of fluorescence on the acrosomal cap (arrow). $\times 470$.

むものと考えた。特に、6時間子宮内で培養した精子ではSCAは検出されなかったと報告している。また豚精子でも、大原¹¹⁴⁾は交配後6時間で子宮から回収した精子の91.3%でSCAに基づく反応が消失していたと報告している。この様に、受精能獲得過程における被覆物質の除去には数時間を要するが、これは射出精子の細胞膜は精巢上体において糖タンパク質を吸着し、ある程度安定化しているが、精漿と接触すると更に安定性が増加す

ると推察されている¹³⁴⁾。Hyne & Edwards⁷⁶⁾は受精能獲得の過程で精子に起こる現象の一つに、Protein kinaseが精子膜タンパク質のPhosphorylationを通じて膜の生理学的形態を変化させ、イオン物質の透過性を増加させると報告している。この様な、精子内へのイオン物質の透過は受精能獲得後、引き続いて起こる先体反応の透起に必要なことであろうが、精子の安定性を急速に低下させることにつながるものと推察される。従っ

て、精子膜の安定化は、精子の受精能保有時間を長く維持するのに必要なことと思われる。

一方、前節で実施した間接蛍光抗体法による子宮腺腔内精子の観察では、蛍光反応消失精子は交配後の時間経過に伴い漸増する傾向は見られたものの、交配後8時間でも30.1%と低値であった。このことは子宮から回収した精子と子宮腺腔内精子とではSCAの消長に差があり、子宮腺腔内では遅くなることを示している。

そこで、本章では子宮腺ではSCAの除去または変化が遅いことを確かめるため、交配後の子宮角から精子を回収し、間接蛍光抗体法によりSCAの消長を観察した。また子宮以外の生殖道についても検討するため、腔内精子を同様に回収し、観察を試みた。

2. 実験材料および方法

供試家兎は雄3羽および雌18羽を用いた。供試精子は、射出精子ならびに交配後4, 6, 8, 10, 12および24時間目の子宮と腔からの回収精子を用いた。回収精子は雌家兎をネブタール麻酔下で放血死させ、開腹後、生殖道内精子の移動を防止するため、腔下部、子宮頸管移行部および子宮卵管接合部を外科用縫合糸で結紮、全生殖道を摘出した後、結紮部位で切断し、子宮と腔内をPBS液(pH 7.2) 0.5 mlで灌流して得た。精子濃度および精子100個の生存率を検査した後、間接蛍光抗体法をShulman¹³⁷⁾の方法に準拠して実施した。すなわち、回収精子を無蛍光スライドガラス上に塗抹し、メタノールで30分間固定し、PBSで洗浄後、本章2節の凍結切片の蛍光染色法と同様に第1抗体に抗家兎精漿ラット血清、第2抗体にFluorescein isothiocyanate結合抗ラットIgG家兎血清を使用し、37°C、湿室内で1時間反応させた。最後に90%グリセリン加PBSで封入し、供試精子100個以上のSCAの消長を蛍光顕微鏡下で観察した。蛍光反応の特異性の検定ならびに蛍光顕微鏡の観察条件は本

章2節と同様である。

3. 結 果

回収した精子の子宮内および腔内精子の濃度ならびに生存率はTable 15に示した通りである。すなわち、精子濃度の平均値は、子宮角では4時間目 $4.9 \times 10^5/\text{ml}$ から10時間目 $12.6 \times 10^5/\text{ml}$ と増加し、腔では交配後4時間目 $207.3 \times 10^5/\text{ml}$ から24時間目 $4.4 \times 10^5/\text{ml}$ と時間経過に伴い減少した。精子生存率は子宮では38~74%、腔では32~68%の範囲を示し、子宮角から回収した精子でやや高い値が得られた。また、4~12時間目にかけて、腔から回収した精子では68%から40%と急速に生存率が低下したのに対し、子宮角では74%から71%と顕著な変動は見られなかった。

子宮角および腔から回収した精子の蛍光反応は、子宮腺腔内精子と同様に先体に強く、先体の離脱した精子頭部には蛍光反応が認められず、遊離した先体に弱い蛍光反応が認められた。これら蛍光反応は特異性の検定では全く認められず、家兎精子SCAに対して特異的反応であることが確認された。

回収精子の蛍光反応消失率はTable 16に示すように、交配後4時間では子宮20.3%、腔19.4%と低値であったが、時間経過に伴い上昇し、12時間では子宮81.3%、腔80.4%とほとんどの精子から消失していた($P < 0.01$)。蛍光反応消失率を子宮と腔で比較してみると、交配後の各時間において子宮から回収した精子はやや高めに推移したが、両者の間に有意の差は認められなかった。

これらのことと、前節の子宮腺腔内精子における蛍光反応消失の推移(Table 14)を交配後12時間で比較すると、子宮腺腔内精子では43.2%と子宮および腔内精子のそれよりも低値であった($P < 0.05$)。従って、子宮腺腔内精子のSCA除去または変化は遅く、時間のかかることが明らかとなった。

Table 15. Concentration and motility of spermatozoa recovered from the rabbit uterus and vagina at different times after mating

Hrs. after mating	Uterine spermatozoa		Vaginal spermatozoa	
	Sperm conc. ($\times 10^5/\text{ml}$)	Motility (%)	Sperm conc. ($\times 10^5/\text{ml}$)	Motility (%)
4	$4.9 \pm 1.4^a)$	74 ± 5.4	207.3 ± 144.6	68 ± 3.1
6	6.4 ± 5.0	67 ± 13.7	96.2 ± 63.5	51 ± 11.6
8	11.7 ± 3.5	71 ± 3.2	8.2 ± 5.9	39 ± 18.6
10	12.6 ± 1.1	68 ± 3.2	6.5 ± 5.5	49 ± 15.1
12	12.6 ± 5.4	71 ± 10.3	9.7 ± 3.0	40 ± 17.3
24	1.8 ± 0.7	38 ± 9.2	4.4 ± 2.9	32 ± 15.0

a) Three does were examined each hour after mating and values were given as the mean \pm S.E.

Table 16. Loss of SCA^{a)} from the rabbit spermatozoa recovered from uterus and vagina after mating^{b)}

Hrs. after mating	Spermatozoa with SCA ^{a)}		Spermatozoa without SCA ^{a)}	
	Uterus	Vagina	Uterus	Vagina
0 ^{c)}	91.9±4.4		9.0±4.4	
4	79.7± 5.8	80.6±14.6	20.3± 6.1	19.4±13.1
6	61.8±12.2	64.8± 9.5	38.2±12.1	35.2± 8.9
8	61.8± 9.6	63.3± 3.7	38.2±10.6	36.7± 1.2
10	42.0± 1.2**	46.1± 3.7**	58.0± 1.7**	53.9± 3.8**
12	18.7± 5.6**	19.6± 8.0**	81.3± 8.1**	80.4± 5.1**
24	8.6± 1.9**	11.1± 5.7**	91.4± 1.3**	88.9± 3.9**

a) SCA: Spermatozoa coating antigens. b) Spermatozoa were recovered with 0.5 ml of phosphate buffered saline. c) Three rabbits were examined each hour after mating and values were given as the mean±S.E. Values for 0 hour were obtained from washed ejaculated rabbit spermatozoa. ** Values were significantly different from those at 0 and 4 hours in each column. (P<0.01).

一方、子宮角から回収した精子で蛍光反応消失が急速に進行したのに対し、精子生存率はほとんど低下することはない。従って、子宮内における SCA の消長は、精子生存率の低下に伴う精子膜の崩壊または死後変化によるものではないことが確認された。

第 4 節 家兎精漿成分における精子被覆抗原の検討

1. 目 的

精子表面の抗原性は精巣内や、精巣上体内で、また射精時や射精後の雌生殖道内で変化することは多くの免疫化学的分析により明らかである。特に、精漿の抗原性は精子の受精能獲得と関連する SCA を含むことから関心を持たれ、精漿に含まれるタンパク質ならびに糖タンパク質について検討されている。

家兎精子の SCA については最初に Weil¹⁵⁹⁾ によって、洗浄した射出精子が抗精漿血清に対して凝集反応を示すことが報告され、その後の生化学的研究で、家兎精子が射精過程で被覆される物質は分子量 20,000 のタンパク質で、比較的分子量であるとされた¹¹¹⁾。しかし、Hunter & Nornes⁶⁵⁾ は家兎精漿に含まれる受精能破壊因子は 120,000 の高分子物質であると主張した。また、Eng & Oliphant³⁸⁾ は *in vivo* で家兎精子の受精を可逆的に抑制し、先体反応を濃度依存様式で妨げる糖タンパク質を先体安定因子 (ASF) と名付け、分子量 355,000 (ゲルクロマトグラフィー法) または 370,000 (ゲル電気泳動法) の糖タンパク質であり、Sephadex G-200 を用いた精漿分画の第 II 分画に含まれると報告した。

他の動物に関しては、牛精子について Vierula & Rajaniemi¹⁵⁵⁾ が分子量 25,000 と 14,000 タンパク質が射精過程で被覆することを、マウス精子では Herr & Eddy⁶⁰⁾ が分子量 34,000 のタンパク質であることを見いだした。更に、ラット精子では、Dravland & Joshi³⁷⁾ が未成熟ラットにテストステロンを投与し、精子を全く含まない精漿から分子量 50,000 のタンパク質を分離している。この様に SCA と関連する精漿成分については研究方法または動物種により著しく異なることが示されている。また、家兎精漿の抗原性は、抗精漿血清を得るために免疫を施した動物が同種または異種であるかによっても異なるといわれており¹⁰⁹⁾、精漿成分と SCA について不明な点が多い。

そこで本実験では第 3 節で間接蛍光抗体法で観察された家兎精子 SCA と精漿成分との関連を明らかにするため、家兎精漿のタンパク質成分をドデシル硫酸ナトリウム (以下、SDS) を含むゲル電気泳動法により明かにし、更にタンパク質分画を分離し、家兎射出精子における分離精漿タンパク質の分布を観察した。また、SDS・ゲル電気泳動法で得られた分離精漿タンパク質とゲルクロマトグラフィー法により得られた分画を比較検討した。

2. 実験材料および方法

家兎精漿は本章第 2 節と同様に、雄家兎 10 羽から人工腔で採取した精液を 3,000 rpm, 15 分間および 11,000 rpm, 30 分間の遠心分離を施し、その上清を用いた。

1) SDS・ゲル電気泳動法による精漿タンパク質の分離

家兎精子を被覆し、間接蛍光抗体法で先体に観察され

た主な精漿タンパク質を分離するため、SDS・スラブゲル電気泳動法を実施した。泳動槽に用いたプレートは分離タンパク質を多量に回収するため、大きさ17×16 cmのガラス板に厚さ5 mmのスペーサーを作製し用いた。ポリアクリルアミドゲルは濃縮ゲル3%, 分離ゲル15%になるよう調整した。

一般に、電気泳動後のバンドパターンを確認するにはCoomassie brilliant blue で染色するが、本実験では精漿タンパク質の活性を損なわずに精漿タンパク質を分離するため、家兎精漿をダンシル蛍光色素で標識した。すなわち、精漿2 mlに蒸留水4.08 ml, 0.5 M トリス塩酸緩衝液 (pH 6.8) 0.16 mlおよび SDS 0.08 gを加えて完全に溶解し、ついで0.3% ダンシルクロライド・アセトン溶液0.4 mlを添加、100°Cで7分間の加熱処理を施し標識した。ついでこの標識精漿にグリセロール1.6 mlと β -メルカプトエタノール0.08 mlを加え、再度100°C、1~2分間の加熱処理を行い、泳動用試料とした。

電気泳動は泳動試料1 mlを濃縮ゲル上に重層し、濃縮ゲル20 mA, 分離ゲル30 mAで実施した。泳動後の精漿タンパク質の回収は、まずゲルに3650Åの紫外線を照射し、蛍光反応を示すバンドを切り出し、細切、ついでバンドごとタンパク質溶出液(0.05% SDS・0.05 M 重炭酸アンモニウム液)をゲル重量の10倍量加え、37°C、6時間の加温振盪を行い、ゲルバンドに含まれるタンパク質を溶出、その上清を精漿の分離タンパク質とした。分離タンパク質は凍結乾燥後、-20°Cに保存した。

2) 精漿タンパク質の糖質反応

精漿タンパク質に糖が結合していることを確認するため、電気泳動後のゲルにPAS反応を施し観察した⁴³⁾。

3) 精漿分離タンパク質による家兎精子 SCA の観察

a. 精漿分離タンパク質による抗血清の作製

精漿分離タンパク質中の何れかが家兎精子を被覆して

いるものと考えられたので、射出精子における分布を間接蛍光抗体法で観察した。精漿分離タンパク質に対する抗血清の作製は、凍結乾燥試料175 mgを蒸留水1 mlに溶解して抗原とし、等量の Freund's complete adjuvant とともに、末経産ラットの皮内に1週間間隔で3回反復投与した。最終投与後1週間目に全採血し、血清を分離、抗精漿分離タンパク質ラット血清を得た。

b. 抗血清のイムノブロット法による検定

得られた抗血清の分離精漿タンパク質に対する特異性の検定は、抗原である分離タンパク質に SDS を含むためオクテロニー法による免疫二重拡散法では沈降線が形成されないので、イムノブロット法¹⁵⁰⁾を実施した。この方法の原理は抗原を SDS・ゲル電気泳動後、それを支持膜上に電気泳動的に転移させ、抗血清との反応性を検定するものである。すなわち、精漿0.5 mlに蒸留水0.26 ml, 0.5 M トリス塩酸緩衝液 (pH 6.8) 20 μ l, SDS 0.01 g, グリセロール0.2 mlおよび β -メルカプトエタノール10 μ mを加えて泳動試料を作製し、大きさ10×9 cm, 厚さ1.5 mmのミニスラブゲル電気泳動槽(3%濃縮ゲル, 15%分離ゲル)に試料10 μ mを重層して泳動した。精漿タンパク質のゲルから支持膜への転移は支持膜にニトロセルロース膜(TM-2, 東洋濾紙)を用い、泳動後のゲルを密着させ、20%メチルアルコールを含む25 mM トリスアミノメタン・192 mM グリシン緩衝液(pH 8.3)を入れた泳動層に装着し、4°C下で、20 V, 4時間の通電を行った。ついで転移した精漿タンパク質に免疫染色を施すため、第一次抗体に分離精漿タンパク質より作製した抗血清を、第二次抗体に Fluorescein isothiocyanate 結合抗ラット IgG 家兎血清(ICN Immuno Biologicals)を用い、37°Cで各1時間浸漬し、振盪しながら反応を行った。これら染色過程において非特異的反応を防ぐため、ブロッキング液(3%牛血清アルブミン

Plate 15. Indirect immunofluorescence staining patterns of freshly ejaculated rabbit spermatozoa produced by different antisera against isolated rabbit seminal plasma proteins (band nos. 1-6) and fluorescein-isothiocyanate conjugated anti-rat IgG rabbit serum. Seminal plasma proteins isolated by SDS electrophoresis (Text-fig. 1.).

Fig. 55. Anti-whole seminal plasma rat serum was used. Note bright fluorescence on the sperm head. ×50.

Fig. 56. Anti- seminal plasma protein (band no. 1) rat serum was used. ×50.

Fig. 57. Anti- seminal plasma protein (band no. 2) rat serum was used. ×50.

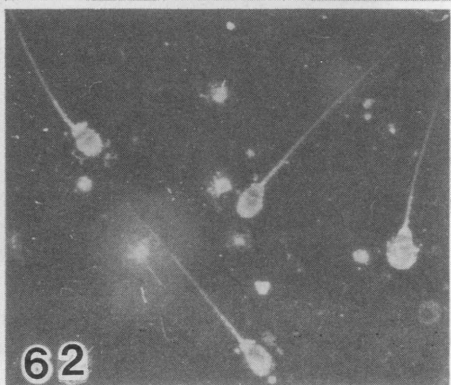
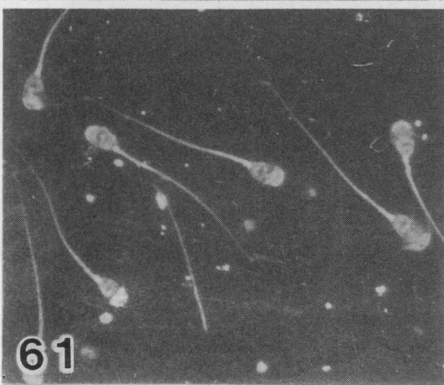
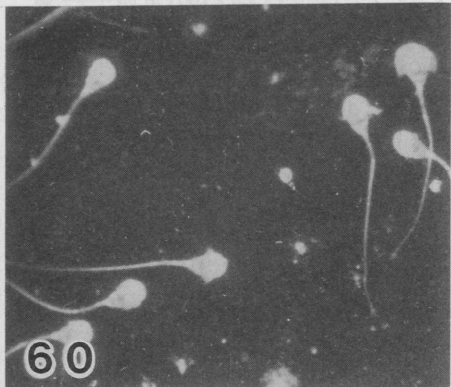
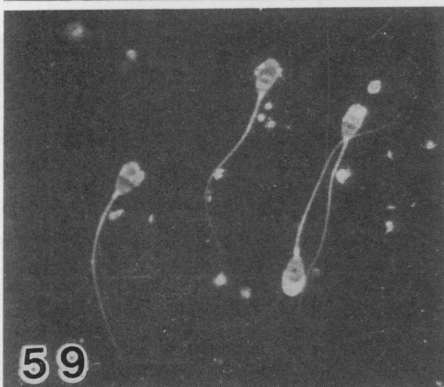
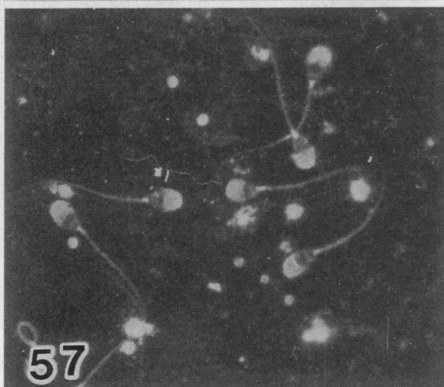
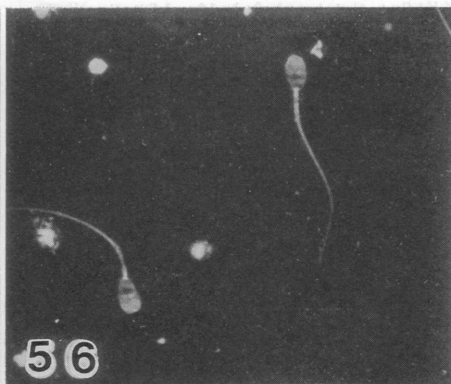
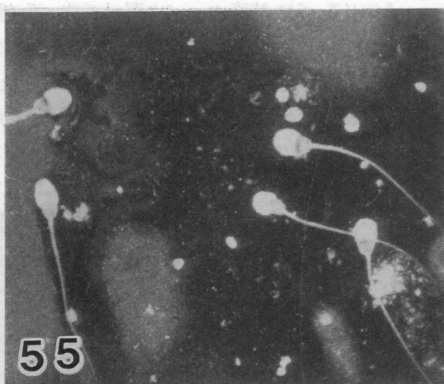
Fig. 58. Anti- seminal plasma protein (band no. 3) rat serum was used. ×50.

Fig. 59. Anti- seminal plasma protein (band no. 4) rat serum was used. ×50.

Fig. 60. Anti- seminal plasma protein (band 5) rat serum used. Note bright fluorescence on the sperm head. ×50.

Fig. 61. Anti- seminal plasma protein (band no. 6) rat serum used was. ×50.

Fig. 62. Specificities of the primary antisera were tested by substituting absorbed antisera with whole seminal plasma for the primary antisera. ×50.



および0.9%塩化ナトリウムを含む10 mM トリス塩酸緩衝液)を用いてニトロセルロース膜の処理および抗血清の希釈を行った。免疫染色後の蛍光反応は3650 Åの紫外線に照射して観察した。泳動後のゲルの一部はイムノブロット法における免疫反応部位を確認するため、Coomassie brilliant blue で染色した。

分子量測定用標準タンパク質は Phosphorylase b (94,000), Bovine Serum Albumin (67,000), Ovalbumin (43,000), Carbonic Anhydrase (30,000), Soybean Trypsin Inhibitor (20,100) および Lactalbumin (14,400) の5種類を用い、精漿と同様に試料を作製し、SDS ゲル電気泳動を実施し、移動度からバンドの分子量を求めた。

c. 家兎射出精子における分離精漿タンパク質の分布
家兎射出精子に間接蛍光抗体法による免疫染色を施し、精子における分離精漿タンパク質の分布を観察した。ここで実施した間接蛍光抗体法は第一次抗体に分離精漿タンパク質をラットに免疫して得た抗ラット血清を用い、第3節の方法と同様に行い、観察した。蛍光反応の特異性検定は第一次抗体に PBS または精漿吸収抗血清を使用し、間接蛍光抗体法を実施した。

4) ゲルクロマトグラフィー法による家兎精漿成分の分画

ゲルクロマトグラフィー法は1.5×100 cmのガラス製のカラム担体 (Sephadex G-75 SF) を充填し、4°C 下で行った。試料の添加は精漿 2 ml を流速 4.8 ml/hr で注入し、ついで10% ショ糖 2 ml を重層、直ちに 50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) を流速 8.0 ml/hr で流し、溶出を開始した。溶出液はフラクションコレクターの試験管に1.3 ml ずつ回収し、波長 280 nm の吸光度を測定した。

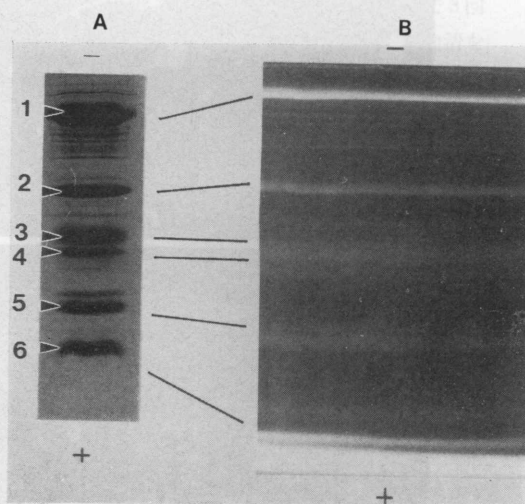
分子量測定用標準タンパク質は Albumin (67,000), Ovalbumin (43,000), Chymotrypsinogen A (25,000) および Ribonuclease A (13,700) の4種類を用い、精漿と同様に溶出を行った。

3. 結 果

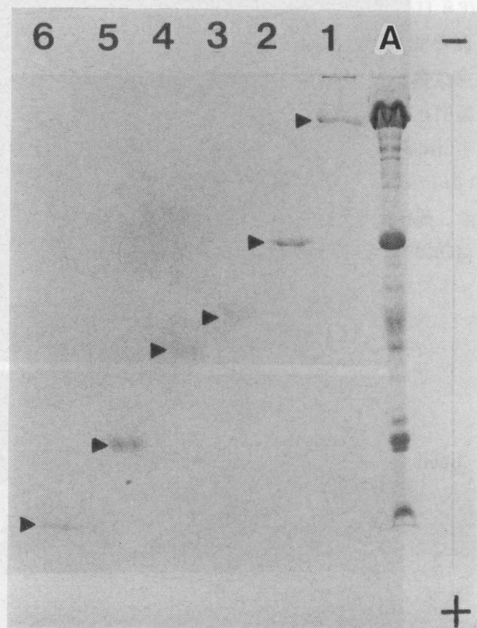
1) SDS・ゲル電気泳動法による精漿タンパク質の分離

電気泳動後、ダンシル蛍光色素により確認された精漿タンパク質の主なバンドは6本であった (Text-fig. 1)。これらバンドに陰極側から1, 2, 3, 4, 5および6の番号を付け区別した。1~6の各バンドからの溶出液を凍結乾燥した時の重量 (mg) は138, 147, 163, 148, 154および169であり、また Lowry 法で求めた各バンドのタンパク質量 (mg) は、乾燥試料 100 mg 当り、1.5, 1.3, 1.6, 2.2, 1.7 および 1.3 で、いずれもバンド間に顕著な差は認められなかった。

バンド1~6の精漿タンパク質が正確に分離回収できたか確認するため、凍結乾燥後の精漿タンパク質を再度電気泳動し、Coomassie brilliant blue 染色を施した。泳動結果は Text-fig. 2 に示した通り、分離後の精漿



Text-fig. 1. SDS gel electrophoresis of rabbit seminal plasma proteins. Gels were stained with Coomassie brilliant blue (A) and dansyl chloride (B).

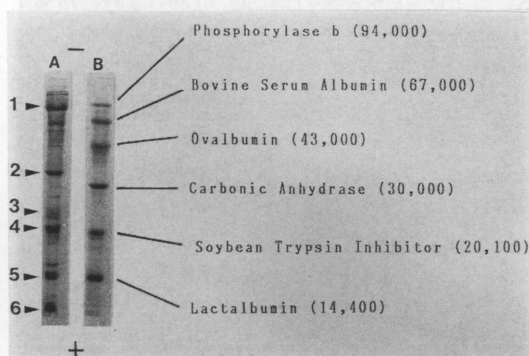


Text-fig. 2. Isolation of rabbit seminal plasma proteins by SDS gel electrophoresis. Whole seminal plasma (A) and isolated seminal plasma proteins (band nos. 1-6).

タンパク質は他のバンドのタンパク質を含まず、明らかに独立して採取されたことが確認された。

標準タンパク質の移動度から求めた各バンドの分離タンパク質の分子量は 73,000, 38,000, 25,000, 23,000, 14,000 および 8,500 であることが示された (Text-fig. 3)。

これら分離タンパク質が糖と結合していることを確認するためにを行った PAS 染色の結果は Text-fig. 4 に示した泳動像ならびにデンストマスター曲線に示した通りである。すなわち、バンド 1, 2 および 5 はやや強く, 3, 4 および 6 は弱く染色され, 各分離精漿タンパク質は糖

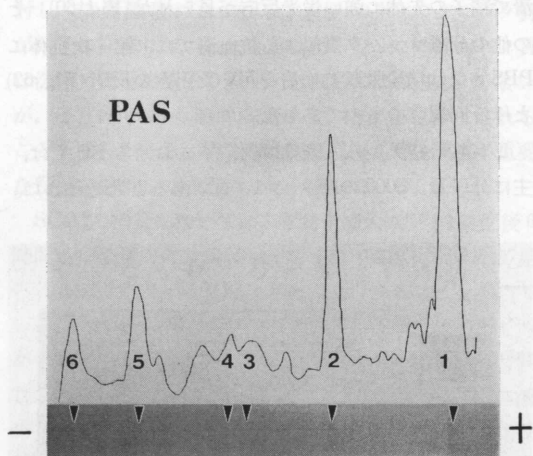


Text-fig. 3. SDS electrophoresis of rabbit seminal plasma (A) and calibration kit proteins (B). Molecular weights of each bands: 1, 73,000; 2, 38,000; 3, 25,000; 4, 23,000; 5, 14,000; 6, 8,500. Proteins were stained by Coomassie brilliant blue.

と結合し, 特に, 1, 2 および 5 に多く結合していることが明らかとなった。

2) 家兎射出精子における分離精漿タンパク質の分布

家兎射出精子に分離精漿タンパク質を用いた間接蛍光抗体法を実施したが, まずイムノブロット法による抗血清の分離タンパク質に対する特異性の検定を行った。その結果は Text-fig. 5 に示した通り, 1~6 の各バンド単独に反応が見られ, 抗血清は各分離タンパク質に対し,



Text-fig. 4. Electrophorogram and gel densitometer tracing of rabbit seminal plasma, stained for glycogen by the Periodic Acid-Schiff (PAS) procedure. Arrows indicate PAS positive bands.

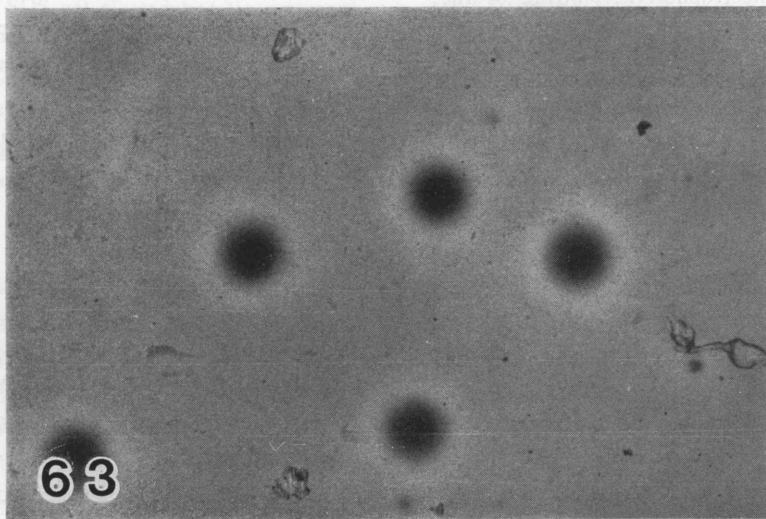
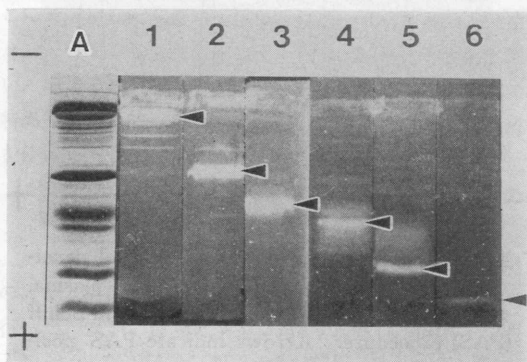


Plate 16.

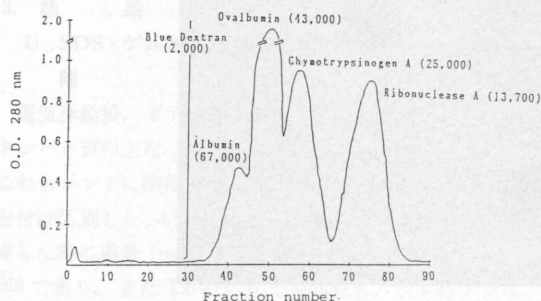
Fig. 63. Hyaluronidase activity of rabbit spermatozoa (recovered from uterus 8 hours after mating) on hyaluronic acid-agarose-substrate film. Hyaluronidase activity, specific for the sperm head (halo), is easily observed. $\times 100$.

特異的反応を示すことが確認された。これらの抗血清による間接蛍光抗体法を家兎射出精子について行った。その反応結果は Figs. 56~62 に示す通りである。すなわち、第一次抗体が分離前の精漿を抗原とした抗血清のときは、第3節で観察された反応結果と同様に精子頭部の先体に強い蛍光反応が見られ、後帽および尾部で弱く観察された (Fig. 55)。分離タンパク質 1~6 を抗原とした抗血清の反応 (Figs. 56~61) では、5 から作製した抗血清で精子の先体に強い蛍光反応が見られた (Fig. 60)。その他の分離タンパク質による抗血清では、第一次抗体に PBS または精漿吸収抗血清を用いたときの反応 (Fig. 62) とほぼ同程度のものであった。

これらの結果から、家兎射出精子における SCA は、主に分子量 14,000 の糖タンパク質であると考えられた。



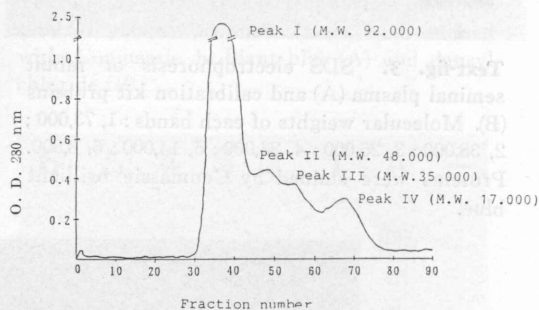
Text-fig. 5. Electrophoretic blotting of the rabbit seminal plasma proteins (band nos. 1-6) in SDS gel electrophoresis (A). Blots were stained with indirect immunofluorescence staining using anti-rabbit seminal plasma proteins (band nos. 1-6) rat serum and fluorescein-isothiocyanate-conjugated anti-rat IgG rabbit serum.



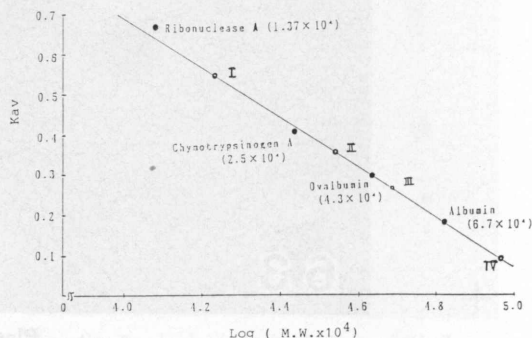
Text-fig. 6. Calibration curve established using the calibration kits protein for gel (Sephadex G-75 SF) column chromatography.

3) ゲルクロマトグラフィー法による精漿タンパク質分離

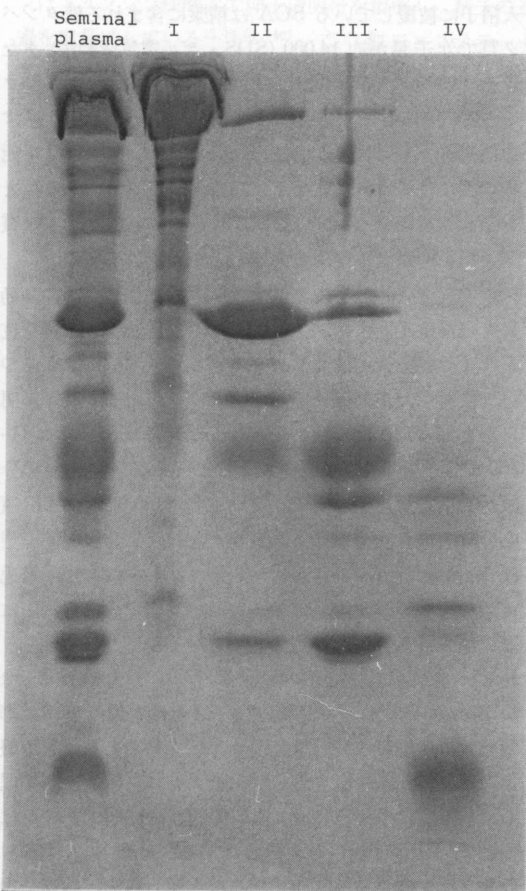
分子量測定用標準タンパク質の溶出曲線は Text-fig. 6 に、家兎精漿の溶出曲線は Text-fig. 7 に、また分子量測定検定量線は Text-fig. 8 に示した通りである。標準タンパク質で溶出ピークが得られた試験管番号は Albumin が 42, Ovalbumin が 50, Chymotrypsinogen A が 57, Ribonuclease A が 75 であり、精漿の溶出ピークは試験管番号 36, 48, 54 および 67 の 4 カ所認められた (Text-fig. 7)。これら分画は以後 1~4 の番号で示した。分子量測定検量線 (Text-fig. 8) から求めた精漿 4 分画のおおよその分子量は分画 1 が 92,000, 分画 2 が 48,000, 分画 3 が 35,000 および分画 4 が 17,000 であった。得られた 4 分画の SDS・ゲル電気泳動像は Text-fig. 9 に示した通りである。クロマトグラフィーにより得られた分画 1 は電気泳動像のバンド 1, 分画 2 はバンド 2, 分画 3 はバンド 3~5, 分画 4 はバンド 6 付近を中心とする分画であることが明らかとなった。従って、分画 3 は、SDS ゲル電気泳動法で精漿から分離したタンパク質の



Text-fig. 7. Fractionation of rabbit seminal plasma by gel (Sephadex G-75 SF) column chromatography.



Text-fig. 8. Molecular weight estimates of each band in rabbit seminal plasma by Sephadex G-75 SF column chromatography.



Text-fig. 9. SDS gel electrophoretic patterns of rabbit seminal plasma and its 4 fractions by Gel (Sephadex G-75 SF) column chromatography.

うち SCA と関連あると考えられる分離タンパク質バンド 5 (分子量 14,000) を含んでいることが確認された。

第 5 節 考 察

第 3 章では、交配後、家兎子宮腔に侵入した精子が腔内で長時間生存し得る可能性として、子宮腔は糖質が多く、白血球またはマクロファージによる精子貪食が少ないことを要因として指摘した。本研究では、更に精子を被覆し、射精後に生殖道内環境から精子を保護する作用があると考えられている SCA の消長と子宮腔内精子の生存性との間には関連があるものと考え、交配後の雌生殖道における精漿成分の分布および消長、子宮腔内精子および子宮腔内精子における SCA の消長、更に精漿成分としての SCA の確認に至る一連の実験を行い、子宮腔における精子保存の可能性を追究した。

本実験では SCA を間接蛍光抗体法により検索した。SCA の生理学的意義を検討した報告は多くあり、Bedford & Chang⁹⁾ は受精能破壊因子の一部は SCA であることを報告している。また、Hunter & Nornes⁶⁴⁾ は、SCA が精漿由来の糖タンパク質で、家兎の受精能獲得を可逆的に抑制することを認めている。Dravland & Joshi³⁷⁾ は未成熟ラットにテストステロンを投与し、全く精子の影響を排除した状態で SCA を検討し、精囊腺液に含まれる分子量 50,000 のタンパク質が精子に被覆していることを確認した。このタンパク質は洗浄では射出精子の表面から容易には除去されないが、子宮内で 4~5 時間培養することにより除去されることを明らかにし、精子の受精能獲得に雌生殖道が重要な役割を果たしていることを示唆している。

SCA の消長については、豚精子で大原¹¹⁴⁾ は交配後 6 時間目で子宮内より回収した精子の 91.3% に SCA が見られないと報告し、交配後急速に進行することを認めている。しかし、家兎精子では、Oliphant & Brackett¹¹⁰⁾ が子宮液とともに培養した精子を観察し、培養後 6 時間目の ¹⁴C 標識抗体の取り込みが培養前に比べ 65% に減少したことを報告し、家兎精子では SCA の除去に比較的時間のかかることを示した。本実験では、家兎の子宮角および腔の両部位から回収した精子では、交配後徐々に SCA の除去または変化が進行し、12 時間目で急激に進むことが明らかであった。すなわち、交配後 10 時間で、各々 58.0%、53.9% と約半数の精子に SCA に基づく蛍光反応の消失が観察されたのに対し 12 時間目では各々 81.3%、80.4% と多数の精子が消失していた (Table 16)。この時間は Adams & Chang²⁾ が家兎子宮角単独で精子を培養したときの受精能獲得時間とほぼ一致し、受精能獲得過程の一部は精子膜からの SCA の除去または変化が含まれることを示している。

一方、子宮腔内精子の SCA 消長についての報告は見当たらない。しかし、本実験における観察結果では子宮腔内精子の SCA の消長は子宮腔内精子よりも遅れることが示された。特に、両部位における蛍光反応消失率を交配後 12 時間目で比較すると、子宮腔内精子で低値であることが明らかとなった。これは Ullmann¹⁵²⁾ が、マウス精子が子宮腔内で長時間生存できるメカニズムの一つとして受精能獲得の遅延をあげており、家兎精子における蛍光反応の消失の遅れはこのことを裏付けたことになる。すなわち、子宮腔内精子は SCA に長時間被覆されていることにより子宮腔内環境から保護されているものと考えられる。このことは子宮腔内精子で白血球またはマクロファージによる貪食の少ないことが

らも推察される。すなわち、Reid¹³¹⁾ は子宮腔では受精能獲得精子が白血球により貪食され易いと報告しており、SCA を保持した状態で子宮腺腔に精子が留まると貪食され難いものと推察される。このことは子宮腺腔における精子生存の可能性を更に支持するものである。

一般に、精子の受精能獲得環境として子宮または卵管が用いられているが、家兎腔についてもいくつか報告されている。本実験においては腔内精子の SCA が子宮におけるのとはほぼ同様な消長を示した。このことと関連して、Dandekar & Fraser²⁹⁾ は腔内で 12~14 時間培養した精子の体外受精率が 81~85% に達したと述べているので、腔内精子における SCA の消長は、子宮角と同様に受精能獲得に伴う変化であると考えられる。

一方、SCA の消長が精子の死滅による退行変性によるものではないかという疑問も残るが、交配後腔内精子では生存性が低下するのに対し、子宮内精子では交配後 4 時間目と 10 時間目の間に生存性に差は認められず、SCA の存在を示す蛍光反応の消失は精子の退行変性に起因するものではないと思われる。大原¹¹⁴⁾ も豚精子における SCA 消長と運動精子との間には関係は認められなかったと報告している。

子宮における SCA の除去または変化は精子と子宮粘液との接触によるものであり、SCA の一部は更に子宮粘膜上皮により吸収されると考えられる。このことは家兎雌生殖道の間接蛍光抗体法による観察結果から明らかとなった。すなわち、本実験において家兎子宮粘膜上皮ならびに子宮腺腔における蛍光反応が交配後 4~12 時間目にかけて強いことが観察されたが、この時間は子宮腔内精子における蛍光反応の消失開始時間とほぼ一致することからも説明できる。豚子宮では精漿が交配後 6 時間で消失すると Mann *et al.*⁹²⁾ は報告しているが、この時間は大原¹¹⁴⁾ が示した SCA 消失時間の 6 時間と一致し、家兎における現象とも適合している。

このように SCA は家兎精子に被覆し、子宮腺腔内精子の生存または受精能獲得と関連していると考えられたが、精漿のどの成分が関与しているかを明らかにするため SDS・ゲル電気泳動法およびゲルクロマトグラフィー法を実施した。その結果、家兎精漿成分は SDS・ゲル電気泳動法では主なバンドとして 6 本、クロマトグラフィー法では 4 分画に分離することができた。間接蛍光抗体法による観察ではこのうちバンド 5 または第 3 分画に含まれる精漿成分が家兎精子 SCA に関与していることが明らかであった。また、泳動後のバンドに含まれるタンパク質を部分精製し、PAS 染色により糖タンパク質であることをも確認した。これらのことから子宮腺腔内侵

入精子に被覆している SCA は精漿に含まれる糖タンパク質で分子量が約 14,000 (SDS・ゲル電気泳動法) または約 35,000 (Sephadex G-75 SF, ゲルクロマトグラフィー法) であることが明らかとなった。SCA と関連する精漿タンパク質について、Reyes *et al.*¹³²⁾ は、受精能破壊因子は PAS 陽性を示す精漿タンパク質であることを示し、また Srivastava & Gould¹³⁹⁾ も糖タンパク質が受精を抑制する作用のあることを報告している。

本実験では、得られた糖タンパク質による受精抑制効果を直接検定せずに、部分精製した分離タンパク質を抗原とする間接蛍光抗体法による観察を行い、SCA について検討したが、低分子の糖タンパク質であることが明らかとなった。Hunter & Nornes⁶⁵⁾ は Sephadex G-200 で分子量 170,000 の糖タンパク質を分画し、この分画が受精を阻止することを見だし、105,000 G の超遠心分離で得た沈渣に含まれることを報告した。岡野¹⁰⁹⁾ は Sephadex G-100 クロマトグラフィーにより、家兎精漿から 4 分画を得、高分子タンパク質を含む分画 I に家兎精漿特異抗原の存在することを示唆した。しかし、Becker *et al.*⁶⁾、Williams *et al.*¹⁶³⁾ ならびに Oliphant & Singhas¹¹¹⁾ は受精能破壊因子または受精能獲得に影響を及ぼす精漿成分は低分子タンパク質であることを報告しており、本実験で得られた糖タンパク質とはほぼ類似している。このように SCA、受精能破壊因子または Eng & Oliphant³⁸⁾ が提唱した ASF が家兎精漿から分離された糖タンパク質であるにも関わらず、高分子物質または低分子物質とその性状が異なっている。このことについて Eng & Oliphant³⁸⁾ は分子量が異なっても先体反応および受精を阻止するのであろうと考えている。従って、本実験で部分精製することのできた糖タンパク質が受精を阻止する作用のあることは十分に推察されるが、先体酵素との関連を更に明らかにする必要がある。

第 5 章 交配後の家兎子宮および腔から回収した精子のヒアルロニダーゼおよびアロシン活性

第 1 節 ま え が き

哺乳動物精子頭部のアクロゾームには数種の酵素が存在し^{20,35,81)}、受精の時に放出され、精子が卵子を取り囲む数層の膜を通過するのに重要な役割をはたすことが知られている⁹⁸⁾。これら酵素にはヒアルロニダーゼおよびアロシンが含まれており、ヒアルロニダーゼは精子頭部から最も早く放出され、卵丘細胞のヒアルロン酸を溶解し、細胞間結合を緩める作用がある⁹⁸⁾。また、アロシン

ンはトリブシン様酵素で卵子透明帯を溶解し、精子の通過を容易にしている^{13,14,51,140})。この他にエステラーゼと考えられている放線冠を溶解する酵素がある^{18,19,171})。

一方、第4章の実験結果から、家兎精子が子宮腔または腔内に滞留すると、急速にSCAが除去されるのに対し、子宮腺腔内精子ではそれが極めて緩徐であることが認められ、子宮腺腔内では、精子膜が長時間安定化しているものと推察された。第3章の実験結果から子宮腺腔内精子は、子宮腔へ移動し受精に関与する可能性が強く示唆されたが、直接卵子との受精試験による確認は困難である。しかし、少なくともSCAの消長が受精能獲得現象と関連あることを確認しておくことは必要である。一般に、受精能獲得が完成したことの指標としては先体反応があげられる。すなわち、受精能獲得に至っていない状態では先体反応は起こらないので、先体反応の確認は受精能獲得の成功を示す判断基準として用いられている¹⁶⁶)。先体反応は、精子が卵子に遭遇したとき、精子膜とその直下にある先体外膜が部分的に融合して小胞を形成し、先体内容物である加水分解酵素が放出されやすくなることである¹⁶⁵)。また、アクロシンは射出精子では精漿中のプロテアーゼインヒビターにより活性が抑制されているが、受精能獲得精子では活性の増加が起こり、その後の先体反応のときに放出されることが知られている^{46,122,173})。従って、交配後の雌生殖道内精子の先体に含まれるヒアルロニダーゼとアクロシンの活性を測定することにより、間接的ながらSCAの消長と受精能獲得との関係を明らかに出来るものと考えられる。

本研究では、家兎精子に及ぼす子宮ならびに腔内環境の影響を推定するために、交配後の精子ヒアルロニダーゼおよびアクロシン活性を組織化学的方法を用い、半定量的に測定した。

第2節 実験材料および方法

供試精子は射出精子および交配後に子宮ならびに腔から回収した精子を用いた。射出精子は人工陰法により採取し、精漿に含まれるヒアルロニダーゼ、アクロシンおよびトリブシンインヒビターを除去するため、直ちにPBS (pH 7.0) で2回反復洗浄を施し用いた。子宮および腔精子は、雌家兎44羽を用い、雄と交配後、hCG (20 IU) を投与し、4, 6, 8, 10 および24時間目に屠殺、子宮と腔から精子を回収し、射出精子と同様に洗浄し用いた。精子の回収にあたっては、子宮卵管接合部、子宮と頸管の移行部および腔の3部位を鉗子で挟み精子が移動しないように注意し、全生殖道を摘出、子宮および腔を分離後、PBS (pH 7.0) 0.5 ml で灌流した。射出精子な

らびに回収精子は、ヒアルロニダーゼ活性検査ではヒアルロン酸フィルム、アクロシン活性検査ではゼラチンフィルムおよびゼラチンスライドに塗抹し観察した。ゼラチンフィルムは、Ficsor *et al.*⁴⁴⁾ がコダック社と開発したゼラチンの厚さが均一なフィルムで、これを譲り受けて使用した。しかし、譲り受けたフィルムは数量が少なかったので、Propping *et al.*¹²⁴⁾ が報告したスライドガラスにゼラチンを直接塗抹するゼラチンスライド法も併用し、アクロシン活性の観察に使用できるかについても検討した。

また、精子の一部はヒアルロニダーゼならびにアクロシン活性と精子頭部形態との関連を検討するため、大沼⁴³⁾の方法に準じ、塗抹標本を作製、緩衝ギムザ液による染色を施し、精子500個の先体形態を観察した。

ヒアルロン酸フィルム、ゼラチンフィルムおよびゼラチンスライドの作製と観察法は次に示す通りである。

1) ヒアルロン酸フィルム法

ヒアルロン酸フィルムは Waibel *et al.*¹⁵⁷⁾の方法に準じて、プラスチックフィルム (Gel-Bond, FMC) 上にステンレス製の Meyerbars (H & W Metering Bar Co.) を用い、1% ヒアルロン酸 (Sigma)・1% アガロース (FMC)・10 mM 塩化カルシウム・0.05% Triton X-100 混合液を1 ml 均等に塗抹し、作製した。このフィルムを20×50 mmの大きさに切断し、スライドガラスに張りつけ、供試精子浮遊液10 μ l をフィルム上に重層風乾後、37°Cの加湿箱内で3時間保温反応させた。反応後、ホルマリン・アセトン液 (37% ホルムアルデヒド液20 ml とアセトン80 ml の混合液) で固定し、染色液 (0.3% トルイジンブルー、0.2% ファストグリーンFCF および0.5% 酢酸を含む80% アセトン液) で染色した。ついで2% 酢酸・80% アセトン液で背景色が無くなるまで脱色した。

2) ゼラチンフィルム法

ゼラチンフィルム (厚さ, No. 2) は予め25×20 mmの大きさに切断し、スライドガラスに接着、供試精子浮遊液5 μ l を重層した。ついで風乾し、37°Cの加湿箱内で15, 30 および60分間保温、反応させた。反応後、スライドガラスをホルマリン液 (37% ホルムアルデヒド液30 ml と蒸留水7 ml) で10分間固定し、トルイジンブルー液 (0.3% トルイジンブルーを含む0.1 M ホウ酸緩衝液, pH 10, 4°C) で30分間染色を施した。

3) ゼラチンスライド法

ゼラチンスライドは5% ゼラチン (Difco) 液0.1 ml をスライドガラス上に滴下、45×25 mmの広さに塗抹、氷上で急速に固定させ、5°Cの低温室で風乾した。ついで

10%ホルマリン液で固定後、7%アンモニア水に浸漬し、風乾後、-20℃に保存した。使用直前にスライドグラスを室温に戻し、0.05 M EDTA-NaOH 緩衝液でゼラチン膜表面を処理し、精子浮遊液 20 μ l を滴下し、塗抹した。風乾後、37℃の湿室内で反応させ、ついで4℃の30%ホルマリン液で固定後、0.8 トルイジンブルー液による染色を施した。反応時間は60分間のみとし、ゼラチンシート法で行った15分間および30分間の反応は行わなかった。

4) ヒアルロニダーゼおよびアクロシン活性の観察法

ヒアルロニダーゼおよびアクロシン活性は総合倍率は100倍とした顕微鏡下で、精子頭部周囲に形成されたハロー (Figs. 63~69) の出現率またはハローの直径を計測し求めた。すなわち、ハロー出現率は精子100個を観察し、ハローを有する精子を数え、ハロー直径は反応精子200個のハローを接眼移動測微計を用い計測した。

第3節 結 果

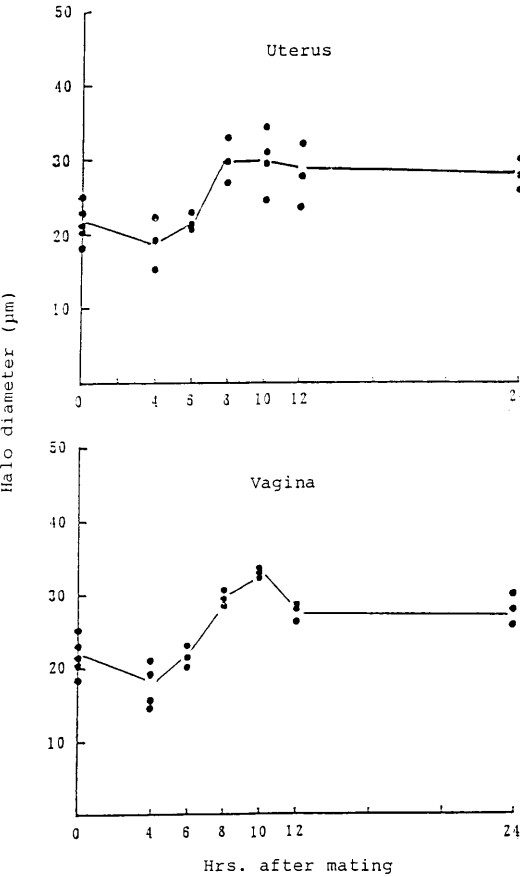
ヒアルロニダーゼおよびアクロシン活性のハロー出現率は Tables 17~19、ハロー直径は Text-figs. 10~12 に示した。また、精子生存率ならびに正常先体率は Tables 20 および 21 に示した。

1) ヒアルロニダーゼ活性

交配後4~24時間目に回収した精子のハロー出現率は、射出精子、子宮または腔内精子の何れにおいても変動は小さく、高値で推移し、交配後24時間目においても、子宮内精子93.8%、腔内精子82.1%を示し、交配後各時間の間に有意差は見られなかった (Table 17)。

一方、ハロー直径は出現率とは異なり交配後の時間経過に伴い増大傾向を示し、8~10時間目で最も大きくなることが明らかとなった (Text-fig. 10)。すなわち、子宮内精子では4時間目14.9~22.3 μ mを示したが、その後活性の上昇が見られ、8~10時間目では24.5~33.0 μ mと高値を示した ($P<0.05$)。また、腔内精子においても

子宮内精子と顕著な差は認められず、ほぼ同様な値で推移し、8~10時間目でハロー直径が大きくなる傾向が認められた。更に、このように大きくなったハロー直径は、子宮内および腔内の何れの精子も交配後24時間目まで顕著に変動することなく推移した。



Text-fig. 10. Hyaluronidase activity of spermatozoa (halo diameters) recovered from the rabbit uterus and vagina after mating.

Table 17. Activity of hyaluronidase in 100 spermatozoa (percentage of halo formation) recovered from the rabbit uterus and vagina

	Hrs. after mating						
	0	4	6	8	10	12	24
Uterine spermatozoa	92.5±0.3 ^{a)} (5)	92.1±0.2 (3)	89.4±0.1 (3)	95.6±0.2 (3)	94.2±0.2 (4)	95.7±0.1 (3)	93.8±0.4 (3)
Vaginal spermatozoa	92.5±0.3 (5)	97.2±0.4 (4)	92.1±0.3 (4)	92.8±0.1 (3)	93.5±0.1 (3)	93.7±0.2 (3)	82.1±0.5 (3)

^{a)} Numbers in () referred to number of does used. Values were given as the mean±S.E.

Table 18. Acrosin activity in 100 spermatozoa (percentage of halo formation) recovered from the rabbit uterus and vagina (Gelatin coated sheets method)

	Incubation times at 37°C (min.)	Hrs. after mating ^{a)}					
		0 ^{b)}	4	6	8	10	24
Uterine spermatozoa	15	73±3.1 ^{c)}	70±3.0	83±2.1	80±2.1	73±1.7	76±3.5
	30	79±6.6	73±3.2	85±3.2	83±2.5	74±1.5	78±2.7
	60	87±2.3*	77±1.0	88±1.7	83±2.5	75±1.5	76±2.1
Vaginal spermatozoa	15	73±3.1	49±9.2	56±5.1	53±2.0	54±0.6	55±10.5
	30	79±6.6	54±7.0	59±5.0	60±4.4	55±3.2	56±3.8
	60	87±2.3*	55±5.3	63±5.3	72±3.5	62±2.7	61±9.8

a) Three rabbits were examined each hour after mating. b) Values for 0 hour were obtained from washed ejaculated spermatozoa. c) Values were given as the mean±S.E. * Values were significantly different from those at 15 minutes in the column ($P<0.05$).

2) アクロシン活性

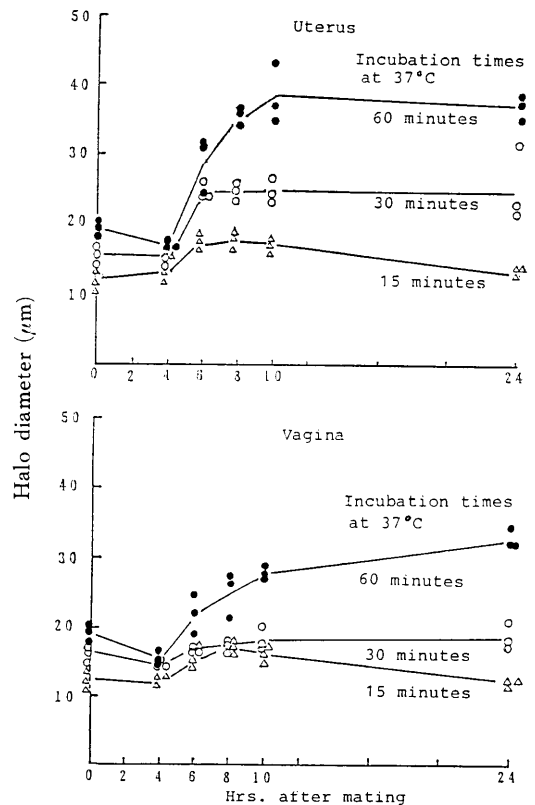
a. ゼラチンシート法

ゼラチンシート法では、まず 37°C、湿室での反応時間がハロー出現率およびハロー直径に及ぼす影響について検討した。ハロー出現率は、射出精子で反応時間が長くなると出現率が高くなり、15分間 73% と 60分間 87% との間に有意差 ($P<0.05$) が認められた。しかし、交配後 4~24 時間目では子宮、腔ともに有意な増加は認められなかった (Table 18)。一方、ハロー直径は反応時間が長くなるにつれて大きくなり、60 分間の反応で最大値が得られた (Figs. 64~69)。この値と 15 分間反応値との間には有意の差が認められた ($P<0.01$)。従って、ハロー出現率および直径の交配後経過時間別比較は 60 分間の値で行った。

子宮内精子のハロー出現率は、交配後 6 時間目でやや高い値が得られたが、75~88% の範囲を示し、腔内精子においても子宮内精子と類似した傾向が見られたが、子宮内精子のそれよりも更に低値で 55~72% の範囲であった。このことは、子宮内ではアクロシン活性を有する精子が多く存在し、腔内ではやや少ないことを示している。しかし、何れの部位においても交配後のハロー出現率は射出精子よりも一般に低く、時間経過に伴う精子アクロシン活性の推移と雌生殖道の関連をハロー出現率から検討するのは困難と思われた。

一方、ハロー直径は交配後時間経過に伴い急速に増大し、子宮内でアクロシン活性の増加することが明らかとなった (Text-fig. 11)。すなわち、子宮内精子では 4 時間目 17 μ m から増加し、10 時間目に 38 μ m と最大値を示した。この 10 時間目の値には射出精子または交配後 4 時間目の値との間に有意の差が認められた ($P<0.01$)。

腔内精子においてもまた、時間経過にともないハロー直径は拡大したが、各時間における値には有意差は認められず、子宮内精子のそれよりもやや小さく推移し、16~



Text-fig. 11. Acrosin activity of spermatozoa (halo diameters) recovered from the rabbit uterus and vagina by gelatin coated sheet technique.

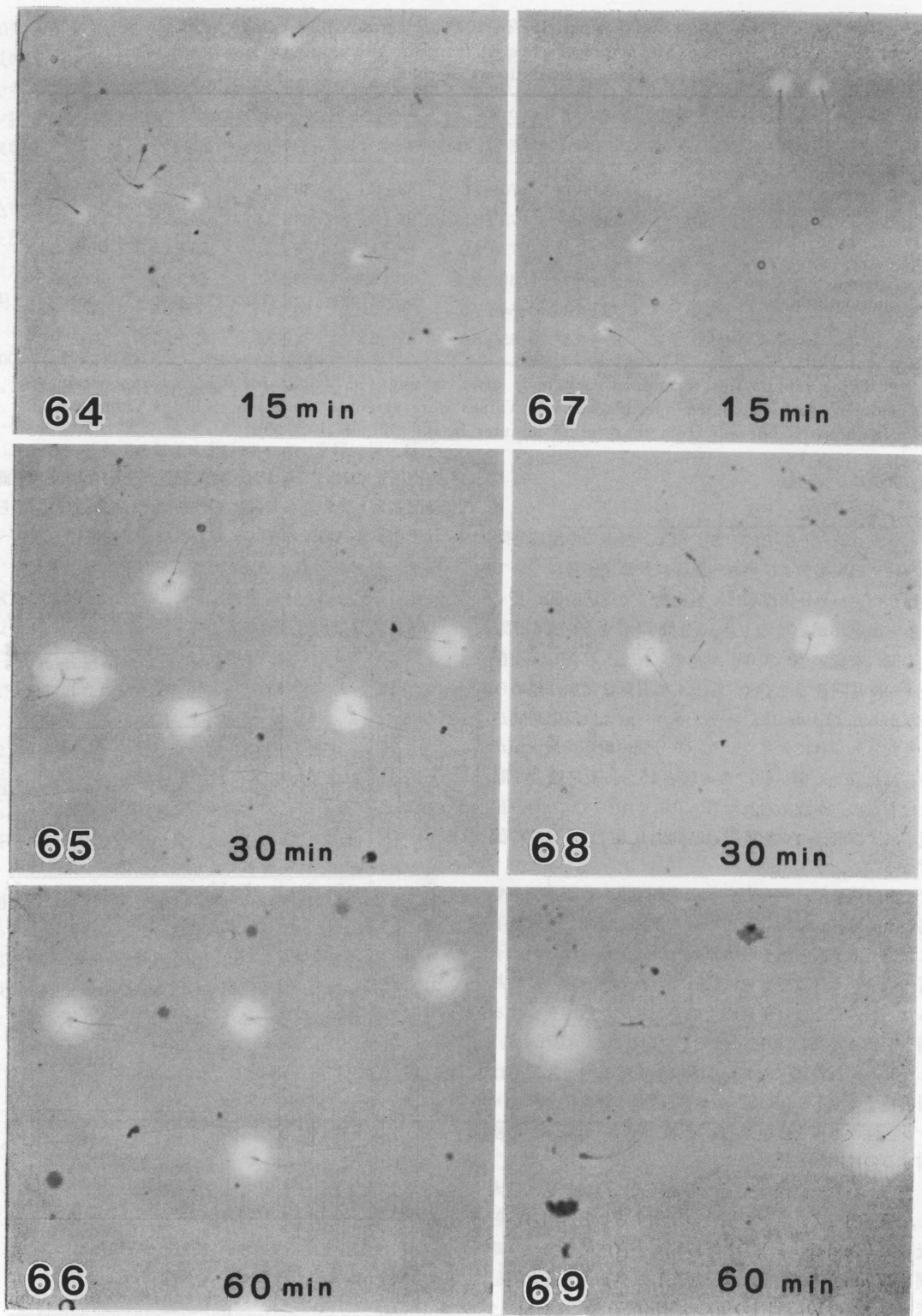


Plate 17. Acrosin activity of rabbit spermatozoa on gelatin substrate film (halo). Sperm coated gelatin substrate film were incubated for 15, 30 and 60 minutes in a humidity chamber at 37°C for enzymatic digestion of the films.

Figs. 64, 65 and 66. Spermatozoa recovered from uterus 6 hours after mating. $\times 200$.

Figs. 67, 68 and 69. Spermatozoa recovered from vagina 6 hours after mating. $\times 200$.

Table 19. Acrosin activity in 100 spermatozoa (percentage of halo formation) recovered from uteri and vaginae of three rabbits (Gelatin coated slide method)

Spermatozoa recovered from	Hrs. after mating.						
	0 ^{a)}	4	6	8	10	12	24
Uterus	80.1±0.3 ^{b)} (5)	85.1±0.6 (6)	83.5±0.1 (4)	84.5±0.1 (5)	82.6±0.4 (5)	72.6±0.9 (6)	72.6±0.6 (5)
Vagina	80.1±0.3 (5)	76.6±3.1 (6)	80.5±1.1 (5)	80.4±1.3 (6)	74.6±0.9 (5)	66.6±0.2 (5)	62.8±1.5 (5)

Numbers in () refere to number of does used.

^{a)} Values for 0 hour were obtained from washed ejaculated spermatozoa. ^{b)} Values were given as the mean±S.E.

33 μ mの範囲を示した。

b. ゼラチンスライド法

ハロー出現率は射出精子では80.1%，子宮内精子では72.6～85.1%，腔内精子では62.8～80.5%の範囲を示し，子宮内精子でやや高くなる傾向が見られ (Table 19), ゼラチンシート法と類似した結果が得られた。交配後の経過時間別比較では出現率の変動は少なかったが，一般に漸減する傾向が見られた。

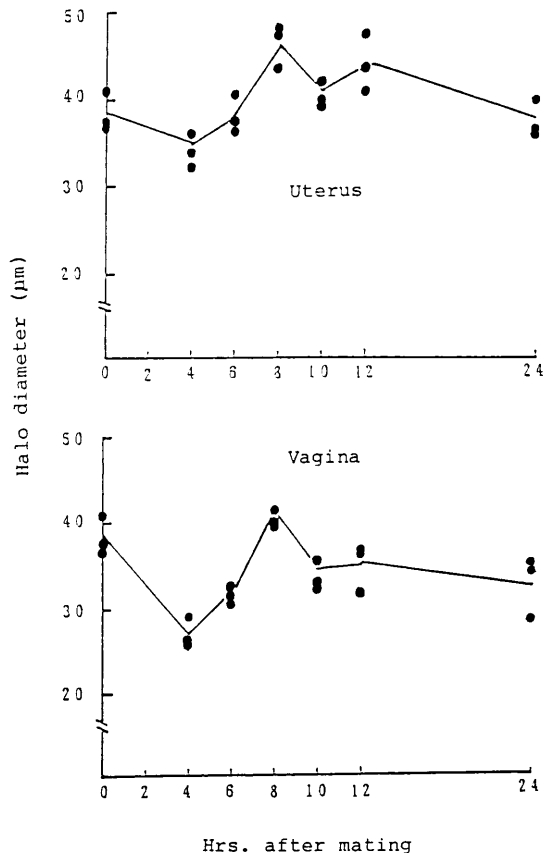
一方，ハロー直径はゼラチンシート法よりも大きく，また，交配後の時間により変動したが，ほぼゼラチンシート法と類似した推移を示し，子宮内精子では交配後4時間目から6,8時間目と時間経過に伴い大きくなる推移を示した。すなわち，子宮内精子では34.7～46.5 μ m，腔内精子では27.1～40.9 μ mの範囲を示した (Text-fig. 12)。また，交配後時間別に見ると，子宮内精子では4時間目34.7 μ mから8時間目46.5 μ mと急増し ($P<0.01$)，10～12時間にかけてほぼ同じ値で推移した。しかし，24時間目では射出精子の値まで低下した。このような傾向は腔内精子においても同様に認められたが，射出精子 (0時間) よりも低値で推移した。

3) アクロシン活性と精子生存率および先体の形態

Table 20 は子宮および腔より回収した精子生存率を示したもので，子宮内精子47～75%および腔内精子35～71%の範囲を示した。子宮内精子の生存率は交配後各時間において，腔内精子のそれよりもやや高い値で推移し，交配後10時間までは急激な減少は見られなかった。しかし，その後低下し24時間目では交配後4時間目または8時間目の値に対し，有意の差が認められた ($P<0.01$)。腔内精子では子宮内精子よりも生存率の低下は速く，6時間目から見られ，その後は顕著な変動はなかった。

正常先体率は子宮内精子では41～70%，腔内精子では30～58%の範囲を示した (Table 21)。すなわち，子宮内精子の正常先体率は腔内精子のそれよりもやや高い値で

推移し，24時間目で顕著に減少したが，4～10時間目にかけての変動は少ないものであった。しかし，腔内精子では交配後の時間経過に伴い減少傾向を示したものの交配後時間により著しく変動した。



Text-fig. 12. Acrosin activity of spermatozoa (halo diameters) recovered from the rabbit uterus and vagina by gelatin coated slide method (incubation times at 37°C: 60 minutes).

Table 20. Percentage of motile spermatozoa in 100 spermatozoa recovered from rabbit uterus and vagina^{a)}

Spermatozoa recovered from	Hrs. after mating					
	0 ^{b)}	4	6	8	10	24
Uterus	82±0.2* (5)	75±0.2* (9)	68±2.6 (8)	72±2.0* (8)	67±1.6 (11)	47±8.9 (9)
Vagina	82±0.2* (5)	71±4.4* (6)	45±0.8 (7)	50±1.9 (8)	60±5.8 (8)	35±2.6 (9)

Numbers in () refer to number of does used.

^{a)} Values were given as the mean±S.E. ^{b)} Values for 0 hour were obtained from washed ejaculated spermatozoa.

* Values were significantly different from those at 24 hours in the line ($P<0.05$).

Table 21. Percentages of uterine and vaginal spermatozoa having intact acrosome cap^{a)}

Spermatozoa recovered from	Hrs. after mating					
	0 ^{b)}	4	6	8	10	24
Uterus	87±4.5 (5)	70±0.2 (5)	10±0.2 (5)	67±0.2 (5)	66±0.9 (4)	41±1.2 (4)
Vagina	87±4.5 (5)	52±0.2 (5)	44±0.1 (5)	55±0.9 (5)	58±0.8 (3)	30±1.0 (4)

Numbers in () refer to number of does used.

^{a)} Values were obtained from 500 spermatozoa and were given as the mean±S.E.

^{b)} Values for 0 hour were obtained from washed ejaculated spermatozoa.

これらの精子生存率および正常先体率の推移とヒアルロニダーゼまたはアクロシン活性との間に、有意な相関関係は得られなかった。

第4節 考 察

精子先体におけるヒアルロニダーゼおよびアクロシン活性を、それぞれヒアルロン酸またはゼラチンを基質とする方法により検討した。これらの観察方法では明瞭なハローが精子頭部周囲に出現した。この反応が両酵素によるものであることは、ヒアルロニダーゼ活性では、100°Cの短時間加熱またはヒアルロニダーゼ阻害剤である Myocrisin¹²⁰⁾ 処理精子でハローが出現しないことから明かである¹⁵⁷⁾。また、アクロシン活性では、ハローが蛋白分解酵素によるものであると考えられてきたが^{44,48,49,119,124)}、ゼラチンの消化を阻止するアクロシン阻害剤 (TCLK) を用いた観察でアクロシンによるものであることが明らかにされている⁴⁴⁾。

本実験の結果から、家兎子宮内に移動した精子が示すヒアルロニダーゼおよびアクロシン活性は交配後の時間経過に伴い急速に増加することが確認された。両酵素の

活性増加は、これまで報告されている家兎精子の受精能獲得時間および前章で示した蛍光反応の消失時間と概ね一致し、受精能獲得過程における SCA の除去または変化に起因するものと考えられた。これらのことから子宮腺腔内精子で観察された SCA の消長は、受精能獲得の遅れを示し、更にヒアルロニダーゼやアクロシンを含む先体内酵素の活性化の遅れにつながるものと推察された。換言すれば、子宮腺腔内への精子侵入の意義の一つとして、侵入精子の多くは射出精子に近い状態で保存されることが推察される。

精子からのヒアルロニダーゼおよびアクロシンの放出は、受精能獲得後に先体反応を発現した精子においてのみ起こり、先体反応は受精直前、少なくとも15分以内に開始し、終了すると報告されている¹⁰⁶⁾。雌生殖道内において、この先体反応を誘起する物質については不明であるが、卵丘細胞または透明帯であろうと考えられている。特に、マウスでは透明帯の糖タンパク質の一つである ZP 3 (分子量, 83,000 Dalton) のポリペプチド鎖が誘起物質となっているようである¹⁵⁸⁾。本実験で観察されたヒアルロニダーゼとアクロシンの活性は交配後10時

間ではほぼ最大値に達していたので、先体反応によるものではなく、それ以前の受精能獲得過程にある精子がSCAの除去または変化により、両酵素の活性化が誘起されたものと推察される。また同様に、SCAの除去または変化にともなう精子膜の生理学的性状¹⁶⁶⁾の変化により、両酵素の放出が容易になったものであろう。すなわち、Wincek *et al.*¹⁶⁴⁾は、豚精子の先体に含まれる非活性型のプロアクロシンは子宮液に含まれるGlycosaminoglycansにより活性型のアクロシンに変化すると報告している。また、*in vitro*においても同じくGlycosaminoglycansによるプロアクロシンの活性化現象は起こるようである¹¹⁸⁾。

一方、精子膜に関しては、子宮内に滞留した精子は、受精能獲得過程で被覆物質が先体部位の細胞膜から徐々に除去されるかまたは変化し、細胞膜におけるAdenylate cyclaseの活性増加を招くといわれている^{11,141,142)}。このAdenylate cyclaseの活性化はcAMP依存のProtein kinaseを刺激し¹⁴¹⁾、精子膜を構成する膜タンパク質のPhosphorylationを通じて精子膜内の構造を変化させる^{25,62,76)}。またフリーズフラクチャー法によるモルモット精子膜の電子顕微鏡観察では、膜内タンパク質の分布が、受精能獲得の前では均一であるのに、受精能獲得後では一部が消失し、多数の斑点状分布に変化するのが認められている¹⁴⁵⁾。このような精子膜の変化は先体内酵素の活性化抑制物質の除去または活性化促進物質の通過を容易にするものと推察される。

精子膜の変化と関連して、コレステロールが細胞膜脂質層の厚さ、流動性、配列などを調整し、細胞膜の特性に影響を与えることから、精子膜に含まれるコレステロールが注目されている⁵⁰⁾。Davis *et al.*³³⁾はラット精子をアルブミンを含む受精能獲得用培地に入ると精子膜からコレステロールの一部が失われると報告し、精子膜からのコレステロールの除去にアルブミンが関与しているものと推察している。またDavis^{31,32)}は*in vivo*で受精能を獲得した家兎精子をコレステロールを含む培地で培養すると急速に受精能力を失うことから、アルブミンまたは雌生殖道粘液に含まれる物質によるコレステロールの除去が受精能獲得の基本的部分であると主張している。しかし、精子膜からのコレステロールの除去は精子膜の極一部に限局され、均一で広範囲な除去は見られないようである⁴⁵⁾。

アクロシンでは、Zaneveld *et al.*¹⁷²⁾は家兎精子先体のトリプシン様酵素が精巣上体精子で高く、射出精子で欠如するが、受精能を獲得した精子で高くなることを示した。またMeizel & Mukerji⁹⁹⁾はアクロシンの前駆

物質であるプロアクロシンが精子の受精能獲得過程の間にアクロシンに変換することを提唱し、Parrish & Polakoski¹¹⁷⁾は、豚精子プロアクロシンを発情期の生殖道内に保存しておく、70~80%がアクロシンに変換することを示した。更に、Goodpasture *et al.*⁵¹⁾は多量のアクロシン阻害物質が受精能獲得および先体反応後の人精子より遊離することを報告している。これらのことは、雌生殖道またはそのなかに含まれる粘液がアクロシンの活性化にとって能動的な役割を果たし、受精能獲得過程でアクロシン酵素阻害物質が精子から除去されることを示している。

ヒアルロニダーゼまたはアクロシンが、先体のどの部位に存在するかは不明であるが、先体内膜に結合しているとの報告がいくつか見られる^{12,103,168)}。しかし、これを電子顕微鏡観察に基づき証明した報告はない⁶³⁾。もしヒアルロニダーゼおよびアクロシンが先体内膜と結合しているのならば、先体内膜からの両酵素の遊離は少ないものと推察されるので、本実験の方法で示される酵素活性は極めて弱い、または観察困難であつたろうと考えられる。

本実験では一般に、子宮内精子のヒアルロニダーゼおよびアクロシン活性は腔内精子のそれよりも高いことが示された。このことに関してDandekar & Fraser²⁹⁾が子宮内では精子の受精能力が長時間保持されるが、腔内精子では短いと報告していることや、前章の観察でSCAの消長に有意な差はなかったものの、腔内精子に比較し子宮内精子でやや高くなる傾向がみられたことから推察すると、子宮内環境はヒアルロニダーゼおよびアクロシン活性を高めることに適しているものと考えられる。

第6章 総 括

家畜の多頭化、省力化飼育が進んでいる現在、受胎率の向上、繁殖能力改善の必要性が求められている。従って、雌生殖道内における精子の動態を明らかにすることは、生殖生理学的基礎を確立するばかりでなく、実際に交配適期を決めるためにも重要な要因であり、受胎率の向上につながるものである。

雌生殖道の精子に関する研究は、古くから多種の動物についてなされ、その詳細な報告がなされている。しかし、その主眼は雌生殖道内における精子の移動および成熟機能を解明することにおかれ、精子の貯留または保存およびそれに伴う諸現象についての解明は極めて不十分である。雌生殖道における精子保存は精子の生存時間に影響を及ぼし、特に家畜の発情が長引いたり、交配が早

すぎたとき保存部位から受精部位への精子の移動は重要な意義を持つことになる。

精子保存部位については、動物種および保存時間により異なるが、子宮頸、子宮腺、子宮卵管接合部および卵管峽部または卵管膨大部があげられている。猿では排卵の直前または直後の頸管内に多くの精子が存在していることが報告されている⁵⁶⁾。同様なことが反芻家畜および家兎においても示唆されている。しかし、頸管粘液に含まれる精子の多くは崩壊しており、動物によっては発情期に生殖道の粘液量が増加し、多数の精子が粘液とともに腔へ、更に体外へ流出しているものと考えられている⁵⁶⁾。従って、頸管粘液が多量に排出される動物では、子宮頸が精子保存部位となる可能性は少ないように考えられる。その一方で、腔内射精動物においては子宮頸に縦走する粘膜ヒダが存在し、精子はヒダに沿って上向して子宮内に至り、子宮腺に入る可能性も述べられている⁵⁶⁾。犬では、雌生殖道内における精子保存時間が長く、生存時間と発情期間との間に関連あることが示唆されている。また、ヨーロッパ野兎における異期複妊娠の例では分娩前に発情と排卵があり、その時に長期間子宮腺腔内に保留されていた精子が受精に関与するといわれており、妊娠 17 日目の子宮腺に精子が認められている⁹³⁾。牛においても、少なくとも交配後 3 日間は子宮腺に精子の存在していることが確認され、それらの精子は生存しているものと推察されている¹⁴⁹⁾。この様な事実に基づき、他の哺乳動物種においても子宮腺が精子の保存および長期生存に重要な役割を果たしている可能性が十分に考えられる。

雌生殖道における精子の保存部位および生存時間を実証し、その意義を解明することは、生殖生理学の基礎となる一側面を確立する上で極めて重要な課題と考えられる。しかし、子宮は雌生殖道の大半を占め、その全域に精子保存の可能性が高い子宮腺が密に分布するが、これと精子との生理学的関係についての情報は極めて乏しい。従って、著者はこの重要な事象を解明するために本研究に着手し、主に家兎で実験し、これを基に一般家畜への応用の糸口をつかもうとした。その結果を要約すれば、次の通りである。

1) 子宮腺腔内精子についての報告は家兎では全く見当らず、また豚および牛での報告も断片的である。そこで子宮腺腔内精子の状況を知らうとして、交配後の家兎 18 羽および豚 6 頭ならびに人工授精後の牛 2 頭の子宮角を用い、子宮角 3 部位の連続切片 (厚さ、7 μ m) 100 枚に出現した子宮腺腔内精子を光学顕微鏡で観察した。家兎では交配後 2 時間目から 0~2,064 個の精子が子宮腺腔

に出現しており、特に、子宮角下部で多く観察された。腺腔内精子の出現は交配後の時間経過に伴い子宮角下部から子宮角上部へと拡大し、4 時間後では子宮角全域の腺腔に分布した。しかし、交配後 48 時間では 0~12 個と減少し、96 時間目では子宮腺腔内精子は見いだされなかった。豚精子は交配後 7 時間および 26 時間 10 分に屠殺した 2 頭の子宮腺腔内に 84~3,556 個の精子が発見され、42 時間 50 分から 49 時間 10 分にかけて屠殺した 4 頭には見いだされなかった。子宮腺腔内精子が観察された 2 頭は排卵前のものであり、他の 4 頭は排卵後であった。牛では排卵前および排卵後の 2 頭に凍結融解精液を人工授精し、24 時間目に屠殺したが両牛とも子宮腺腔内に 37~417 個の精子が観察された。一般に子宮腺腔内精子の多くは精子頭部を腺底方向に向けており、腺開口部方向または子宮内膜と平行なものも少数見られた。この腺開口部方向を向く精子の存在は子宮腺からの精子脱出の可能性を強く示唆している。また、各動物とも、子宮腔内には白血球が浸潤し、多数の精子と接触しているのが見られたが、子宮腺腔内における精子貪食の頻度は極めて少なかった。腺腔内における精子の方向および貪食率を具体的に示したのは本研究が最初である。

なお、家兎および豚の子宮内膜表面の SEM 観察で子宮腺開口部に頭部を突入し、子宮腔に尾部を出している精子が観察された。この電顕像からも精子の子宮腺腔内侵入は明瞭であり、特に、豚精子においては集中的に入ろうとしている様子が窺われた (第 3 章 第 2 節)。

2) 上記の観察で、精子は偶然に子宮腺に入ったのではなく、自らの運動性により子宮腺腔に侵入したものと推察された。そこで精子の運動性と精子侵入との関連を明らかにするため、人工腔で採取した家兎および牛精子または凍結融解の反復により死滅させた家兎精子を 20 羽の家兎子宮内に注入し、子宮腺腔内精子数の変動を観察した。その結果、生存精子のうち家兎精子の注入では 146~5,264 個、牛精子の注入では 233~51,730 個の子宮腺腔内精子が観察されたが、死滅精子の注入では 0~98 個の精子しか観察されなかった。しかし、死滅精子の注入後、子宮角の両端を結紮すると侵入精子は多くなり、0~568 個の範囲を示した。これら死滅精子の数は生存精子数に比較して非常に少なく、また、そのほとんどが貪食されていた (42.0~100%)。このことから交配後の子宮腺腔内精子は、主に精子自身の運動性により侵入したものであり、子宮収縮の影響はあっても極めて少ないものと思われた (第 3 章 第 3 節)。

3) Doak *et al.*³⁶⁾ は犬子宮腺腔内精子の消失と発情持続時間とが関連し、また、Martinet & Raynaud⁹³⁾

は野兎で異期複妊娠の原因が分娩前発情時に子宮腺腔内から脱出する精子により起こると考えた。このことは発情および排卵と子宮腺腔内精子の消失が関連していることを推察させる。しかし、これを証明した報告はない。そこで家兎 20 羽を用い、hCG とインドメサシンを投与し、排卵誘起または排卵抑制が子宮腺腔内精子数の消長に及ぼす影響を調べた。その結果、hCG 投与区では精液注入後 2 日目で腺腔内精子が消失したのに対し、hCG 無投与およびインドメサシン投与区では交配後 5 日目まで認められ、特に無投与区では精子数が 185~341 個、平均 243 個を数えた。一方、子宮腔内の精子は hCG 投与区では 1 日目、無投与区およびインドメサシン区では 2 日目で消失していた。

この様に精液注入後、子宮腔内精子が 1~2 日で消失するのにに対し、排卵誘起のない家兎子宮腺腔に精子は長時間滞留することが示された。この子宮腺腔内精子が排卵刺激により子宮腔へ移動するのを顕微鏡下で直接立証することは困難であるが、子宮腺が精子保存部位として機能することを示すには更に子宮腺腔からの精子移動を追究する必要があると考えられた。そこで家兎 25 羽を用い、子宮角内に精液を注入後 1~5 日目に排卵を誘起 (hCG 投与) し、24 時間後に屠殺、子宮腺腔内精子数と子宮腔内から回収した精子数を調べた。その結果、子宮腺腔内精子は 5 日目に hCG 投与した家兎でも観察され、子宮腔内精子は 4 日目まで回収することができ、回収精子の生存率は平均 19% であった。この 4 日目の子宮腔内精子の存在は、hCG 無投与および hCG 投与後精液を注入した実験では認められなかったものであり、子宮腺腔内精子が排卵にかかわる刺激を受け、子宮腔内に移動してきたものと考えられた。この子宮腔へ移動した精子が受精に関与するか否かを検討するため、精子の回収と同時に、卵管から卵子を回収した。その結果、29~50 個の卵子を回収し、1~4 日目に排卵を誘起した 4 群の家兎の 20~40% に 1~8 個の極体 2 個を有する卵 (比率 2~20%) を得ることができた。この卵と子宮腺腔から移動した精子とを直接結びつけることはできないが、その可能性は十分にあるものと推察された (第 3 章 4 節)。

4) 子宮腺腔内精子が、主に精子自らの運動性による侵入であることは明らかで、これは精子が子宮腺分泌液に対し走性を示したものと推察された。それで豚 (第 3 章第 2 節の 6 頭) および家兎 (10 羽) の子宮腺を組織化学的に観察し、精子の代謝基質と関連のある多糖類、酸性ムコ多糖類および脂質の検索を試みた。また、これとは別に子宮腺腔が精子保存部位としての機能を有するこ

とを確認するため、子宮腺における精子処理、すなわち腺腔内における精子消化についても調べるため、酸性ホスファターゼ活性の分布について観察した。その結果、豚子宮腺では、精子侵入の見られた個体で PAS および AB-pH 2.5 染色法に対し陽性反応を検出した。また家兎においても PAS および AB-pH 2.5 染色法ともに陽性反応を認め、更に、AB-pH 1.0 染色法についても陽性反応を確認した。豚および家兎子宮腺の PAS 染色にはジアスターゼ消化による染色性の変化は見られなかった。一方、家兎でズダン・ブラック B およびオイルレッド O 染色法により脂質の検索を試みたが、両染色法とも子宮腺細胞または腺腔内に陽性反応を示さなかった。従って、子宮腺腔内への精子侵入は、主にジアスターゼに消化されにくい多糖類または酸性ムコ多糖類に対し走性を示したものと考えられた。

酸性ホスファターゼ活性には硝酸鉛法を用いたが、交配後 4~72 時間目の子宮腺腔および腺腔内精子周囲に陽性反応は見られなかった。この結果は、子宮腺細胞または腺腔内に精子を消化する機能がないことを示しており、Austin⁵⁾ および Zamboni¹⁷⁰⁾ の観察した子宮腺細胞内精子は精子消化とは直接的な関連はないように思われる。現に Zamboni¹⁷⁰⁾ の報告した電顕写真の精子には消化に伴う形態的崩壊像は認められていない (第 3 章 第 5 節)。

5) これまでの一連の実験結果から、子宮腺腔内への精子の侵入は生存精子が自らの運動性により、また、子宮腺から分泌される粘液に対して走性を示し侵入するものと考えられた。更に、子宮腺に侵入した精子は排卵刺激が加わると子宮腔へ移動し、受精に関与する可能性が示唆された。しかし、子宮腺腔内精子の受精能について検討した報告は皆無である。

そこで子宮腺腔内精子が長時間受精能を維持することを確認するため、精子の受精能獲得過程で消失するといわれている SCA の消長を免疫組織化学的に検索した。まず、交配後の家兎 35 羽の生殖道内における精漿成分の分布および子宮腺腔内精子における SCA の消長を追跡した。精漿成分および SCA の観察は遠心分離後の家兎精漿を抗原とした抗家兎精漿ラット血清を用い、間接蛍光抗体法¹³⁷⁾ を実施した。その結果、雌生殖道における蛍光反応は、交配直後は腔のみに見られたが、時間経過に伴い子宮頸、子宮、更に卵管へと拡散し、交配後約 8 時間で雌生殖道全体に広がった。これは雌生殖道内上皮における精漿成分の吸収をも意味しているものと考えられた。一方、子宮腺腔内精子の頭部先体における SCA の除去または変化を示す蛍光反応の消失率は交配後 4 時

間目の25.4%から12時間目の43.2%と漸増傾向が見られ、24時間目では65.2%を示した(第3章 第2節)。

これに対し、子宮腔から回収した精子の蛍光反応消失率は4時間目20.3%と子宮腺腔内精子とはほぼ同様な値であったが、10時間目では58%と急増し、4時間目との間に有意な差が認められた($P<0.01$)。更に、12時間目に到っては81.3%とほとんどの精子でSCAが消失した。すなわち、子宮腺腔内精子のSCAの除去または変化は、子宮腔内精子に比較して遅く、子宮腺腔内では受精能獲得が緩慢に進むものと考えられた(第4章 第3節)。

6) 上記の子宮腺腔内および子宮腔内精子のSCAが精漿成分の糖タンパク質であることは多くの報告から明らかである。しかし、糖タンパク質の分子量については報告により異なり、不明な点がある。そこで家兎精漿成分をSDS・ゲル電気泳動法により泳動し、6本のバンドが得られ、これらはPAS染色を施したところ糖タンパク質であることが確認された。そこで6本のバンドから糖タンパク質を部分精製し、これを抗原として抗精漿分離タンパク質ラット血清を作製して間接蛍光抗体法を実施した。その結果、6本のバンドの内、分子量14,000の糖タンパク質から作製した抗血清で、精子頭部の先体に明瞭な蛍光反応が出現し、他の5本のバンドから作製した抗血清の反応はきわめて弱いものであった。また、この反応の出現した糖タンパク質は、ゲルクロマトグラフィー(Sephadex G-75 SF)法で得られた4分画のうち、第3分画に含まれることが確認され、この分画の分子量は約35,000であった。

これらのことから家兎子宮腺腔内精子および子宮腔内精子のSCAは、精漿に含まれる糖タンパク質で、SDS・ゲル電気泳動法では分子量14,000、ゲルクロマトグラフィー法では分子量約35,000に相当するものと考えられた(第4章 第4節)。

7) 前述の実験で、子宮腺腔内精子のSCA除去または変化の遅いことを示したが、このことは受精能獲得の遅延につながり、精子が子宮腺腔で長時間生存し得る条件となるものと推察した。そこでSCA除去または変化が受精能獲得の一過程であることを明らかにするため、受精能獲得精子でヒアルロニダーゼおよびアクロシン活性が高進することに着目し、家兎44羽を用い、交配後、子宮から回収した精子のSCAの消長と両酵素活性の推移とを比較検討した。その結果、ヒアルロニダーゼ活性(ハロー直径)は交配後8~10時間目、またアクロシン活性においてもほぼ10時間で酵素活性が最も高まった。これらの酵素活性の推移は、子宮内精子でSCAの除去

または変化が急増する時間(交配後10時間)およびこれまで報告されている家兎精子の、子宮内受精能獲得時間10~11時間¹³⁵⁾とも一致した。すなわち、子宮腔内または子宮腺腔内精子におけるSCA除去または変化は受精能獲得の少なくとも一過程であることが再確認されたことになる(第5章)。

本研究における結果は、家兎子宮腺腔内に精子が侵入することを具体的に示し、また子宮腺腔内では精子の受精能獲得が遅いことを明らかにした最初の例である。これらの結果は、家兎子宮腺腔内で精子が受精能力を有する状態で保存されている可能性が大きいことを示している。更に、子宮腺腔内精子の一部が頭部を腺開口部方向に向けていたことと、排卵誘起により子宮腔内精子数が増加したことは、子宮腺腔からの精子移動を強く示唆しているものである。本実験では子宮腺腔内精子を求めるのに、子宮角の上部、中央部および下部の3部位の連続切片を、光学顕微鏡下で多くの時間をかけて観察した。しかし、得られた精子数は子宮角の一部の子宮腺腔の精子であり、両側子宮角の子宮腺には相当数の精子が侵入しているものと推察される。本研究では子宮腺腔内に存在した精子と卵受精との直接関係を立証するまでには至らなかったが、少なくともその可能性の高いことを示した。従って、今後、受精ならびに受胎に関する詳細な生殖生理学的研究のためには子宮腺腔内精子の存在を無視することは出来ないものとする。

謝 辞

稿を終わるに当たり、本研究のご指導と論文のご校閲を賜った広島大学生物生産学部、堤 義雄教授に深甚の謝意を表す。また、論文のご校閲を煩わせた広島大学生物生産学部、岡田育穂教授、田村達堂教授ならびに寺田隆登教授に衷心から謝意を表す。さらに、論文のご校閲を煩わせるとともに本研究の遂行に当り、懇切なる教授ならびに有益なる助言をいただいた酪農学園大学酪農学部、平尾和義教授に拝謝する。

本実験の一部は北海道大学農学部畜産学科家畜育種学講座のご協力をいただいた。また、統計学的処理については、北海道大学農学部、清水 弘教授のご指導を賜り、ここに厚くお礼申し上げる。

引用文献

- 1) Abrescia, P., G. Lombarli, M. DeRosa, L. Quagliozi, J. Guardiola & S. Metafora (1985): Identification and preliminary characterization of a sperm-binding protein in normal human

- semen. J. Reprod. Fert., **73**: 71-77.
- 2) Adams, C. E. & M. C. Chang (1962): Capacitation of rabbit spermatozoa in the fallopian tube and in the uterus. J. Exp. Zool., **151**: 159-165.
- 3) Austin, C. R. (1951): Observations on the penetration of the sperm into the mammalian eggs. Aust. J. Sci. Res., **4**: 581-586.
- 4) Austin, C. R. (1952): The capacitation of mammalian sperm. Nature, London, **170**: 326.
- 5) Austin, C. R. (1960): Fate of spermatozoa in the female genital tract. J. Reprod. Fert., **1**: 151-156.
- 6) Becker, R. A., C. N. Graves & W. L. Hurley (1968): Rabbit seminal plasma and spermcoating proteins: analysis by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. J. Anim. Sci., **63**: 336.
- 7) Bedford, J. M. (1968): Importance of the fallopian tube for capacitation in the rabbit. Proc. Int. Congr. Animal Reprod. 6th Paris, **1**: 35-37.
- 8) Bedford, J. M. (1969): Limitations of the uterus in the development of the fertilizing ability (capacitation) of spermatozoa. J. Reprod. Fert. Suppl., **8**: 19-26.
- 9) Bedford, J. M. & M. C. Chang (1962): Removal of decapacitation factor from seminal plasma by highspeed centrifugation. Am. J. Physiol., **202**: 179-181.
- 10) Bellve, A. R. & M. F. McDonald (1968): Directional flow of fallopian tube secretion in the Romney ewe. J. Reprod. Fert., **15**: 357-364.
- 11) Berger, T. & E. D. Clegg (1983): Adenylate cyclase activity in porcine sperm in response to female reproductive tract secretions. Gamete Res., **7**: 169-177.
- 12) Bhattacharyya, A. K. & L. J. D. Zaneveld (1977): Acrosion release from human spermatozoa. Fed. Proc., **36**: 371.
- 13) Bhattacharyya, A. K. & L. J. D. Zaneveld (1978): Release of acrosin and acrosin inhibitor from human spermatozoa. Fertil. Steril., **30**: 70-78.
- 14) Bhattacharyya, A. K., J. C. Goodpasture & L. J. D. Zaneveld (1979): Acrosin of mouse spermatozoa. Am. J. Physiol., **237**: E40-E44.
- 15) Bishop, D. W. (1956): Active secretion in the rabbit oviduct. Am. J. Physiol., **187**: 347-352.
- 16) Black, D. L., L. V. Crowley, R. T. Duby & C. H. Spillman (1968): Oviduct secretion in the ewe and the effect of oviduct fluid on oxygen uptake by ram spermatozoa *in vitro*. J. Reprod. Fert., **15**: 127-130.
- 17) Black, D. L., R. T. Duby and J. Riesen (1963): Apparatus for the continuous collection of sheep oviduct fluid. J. Reprod. Fert., **6**: 257-260.
- 18) Bradford, M. M., R. A. McRorie & W. L. Williams (1976 a): A role of esterases in the fertilization process. J. Exp. Zool., **197**: 297-301.
- 19) Bradford, M. M., R. A. McRorie & W. L. Williams (1976 b): Involvement of esterases in sperm penetration of the corona radiata of the ovum. Biol. Reprod., **15**: 102-106.
- 20) Castellani-Ceresa, L., G. Berruiti & R. Colombo (1983): Immunocytochemical localization of acrosin in boar spermatozoa. J. Exp. Zool., **227**: 297-304.
- 21) Chang, M. C. (1951): Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. Nature, London, **168**: 697-698.
- 22) Chang, M. C. (1955): Development of fertilizing capacity of rabbit spermatozoa in the uterus. Nature, London, **175**: 1036-1037.
- 23) Chang, M. C. (1957): A detrimental effect of seminal plasma on the fertilizing capacity of sperm. Nature, London, **179**: 258-259.
- 24) Chernoff, H. N., M. G. Pinsker, W. R. Dukelow & W. L. Williams (1966): Purification of sperm antifertility factor. (Abstract). Fed. Proc., **25**: 284.
- 25) Clegg, E. D., D. J. Morré & D. D. Lunstra (1975): Porcine sperm membranes: *in vivo* phospholipid changes, isolation and electron microscopy. In "The Biology of the Male Gamete", (J. C. Duckett & P. A. Racey, eds.), Suppl. No. 1 to the Biological Journal of the Linnean Society. Vol. 7, pp. 321-355.
- 26) Clegg, E. G. (1983): Mechanisms of mammalian sperm capacitation. In "Mechanism and Control of Animal Fertilization", (J. F. Hartmann, ed.), pp. 177-212. Academic Press, New York.
- 27) Clewe, T. H. & L. Mastroianni (1960): A method for continuous volumetric collection of oviduct secretions. J. Reprod. Fert., **1**: 146-150.
- 28) Collad, M. L., G. Castro & J. J. Hicks (1979): Effect of spermatozoa upon carbonyl anhydrase activity of rabbit endometrium. Biol. Reprod., **20**: 747-750.
- 29) Dandekar, P. & L. Fraser (1976) A comparison of *in-vitro* fertilization of rabbit eggs using spermatozoa recovered from the uterus or vagina. J. Reprod., Fert., **46**: 77-81.

- 30) Dauzier, L. (1958): Physiologie du déplacement des spermatozoïdes dans les voies génitales femelles chez la brebis et la vache. *Annls Zootech.*, **7**: 281-301.
- 31) Davis, B. K. (1976): Inhibitory effect of synthetic phospholipid vesicles containing cholesterol on the fertilizing capacity of rabbit spermatozoa. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **152**: 257-261.
- 32) Davis, B. K. (1981): Timing of fertilization in mammals: sperm cholesterol/phospholipid ratio as a determinant of the capacitation interval. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**: 7560-7564.
- 33) Davis, B. K., R. Byrne & B. Hangund (1979): Studies on the mechanism of capacitation II. Evidence for lipid transfer between plasma membrane of rat sperm and serum albumin during capacitation *in vitro*. *Biochem. Biophys. Acta.*, **558**: 257-266.
- 34) Day, F. T. (1942): Survival of spermatozoa in the genital tract of the mare. *J. Agric. Sci.*, **32**: 108-111.
- 35) De Vries, J. W. A., R. Willemsen & H. J. Geuze (1985): Immunocytochemical localization of acrosin and hyaluronidase in epididymal and ejaculated porcine spermatozoa. *Eur. J. Cell Biol.*, **37**: 81-88.
- 36) Doak, R. L., A. Hall & H. E. Dale (1967): Longevity of spermatozoa in the reproductive tract of the bitch. *J. Reprod. Fert.*, **13**: 51-58.
- 37) Dravland, E. & M. S. Joshi (1981): Sperm coating antigens secreted by the epididymis and seminal vesicle of the rat. *Biol. Reprod.*, **25**: 649-658.
- 38) Eng, L. A. & G. Oliphant (1978): Rabbit sperm reversible decapacitation by membrane stabilization with a highly purified glycoprotein from seminal plasma. *Biol. Reprod.*, **19**: 1083-1094.
- 39) Ericsson, R. J. (1967 a): A fluorometric method for measurement of sperm capacitation. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **125**, 1115-1118.
- 40) Ericsson, R. J. (1967 b): Technology, physiology and morphology of spermatozoa capacitation. *J. Reprod. Fert. Suppl.*, **2**: 65-74.
- 41) Ericsson, R. J. & V. F. Baker (1967): Binding of tetracycline to mammalian spermatozoa. *Nature, London*, **214**: 403-404.
- 42) Espey, L. L. (1981): Optimum time for administration of ndomethacin and other nonsteroidal antiinflammatory agents to inhibit ovulation in the rabbit. *Biol. Reprod.*, **24** (Suppl.), 46 A.
- 43) Fairbanks, G., T. L. Steck & D. F. H. Wallach (1971): Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry*, **10**: 2606-2617.
- 44) Ficsor, G., L. C. Ginsberg, G. M. Oldford, R. E. Snoke & R. W. Becker (1983): Gelatin-substrate film technique for detection of acrosin in single mammalian sperm. *Fertil. Steril.*, **39**: 548-552.
- 45) Friend, D. S. (1980): Freeze-fracture alterations in guinea pig sperm membranes preceding gamete fusion. In "Membrane-Membrane Interactions", (N. B. Gilula, ed.), pp. 153-165, Raven Press, New York.
- 46) Fritz, H., H. Schiessler & W.-D. Schleuning (1973): Proteinases and proteinase inhibitors in the fertilization process: new concepts of control?. *Advan. Biosci.*, **10**: 271-286.
- 47) Fuchs, A.-R. (1972): Uterine activity during and after mating in the rabbit. *Fertil. Steril.*, **23**: 915-923.
- 48) Gaddum-Rosse, P. & R. J. Blandau (1972): Comparative studies on the proteolysis of fixed gelatin membranes by mammalian sperm acrosomes. *Am. J. Anat.*, **134**: 133-144.
- 49) Ginsberg, L. C., S. C. Johnson, N. Salama & G. Ficsor (1981): Acrosomal proteolytic assay for detection of mutagens in mammals. *Mutation Research*, **91**: 413-418.
- 50) Go, K. J. & D. P. Wolf. (1983): The role of sterols in sperm capacitation. *Adv. Lipid Res.*, **20**: 317-330.
- 51) Goodpasture, J. C., P. M. Zavos, M. R. Cohen & L. J. D. Zaneveld (1981): Effects of various conditions of semen storage on the acrosin system of human spermatozoa. *J. Reprod. Fert.*, **63**: 397-405.
- 52) Gould, K. G. (1973): Application of *in vivo* fertilization. *Fed. Proc.*, **32**: 2069-2074.
- 53) Gregoire, A. T. & B. J. Guinness (1968): Cyclic and pre-ovulatory changes in the glycogen content of the female hamster genital tract. *J. Reprod. Fert.*, **17**: 427-432.
- 54) Griffiths, W. F. B. & E. C. Amoroso (1939): Pro-oestrus, oestrus, ovulation and mating in the Greyhound bitch. *Vet. Rec.*, **51**: 1279-1284.
- 55) Gwatkin, R. B. L. (1977): Fertilization mechanisms in man and mammals. Plenum Press, New York.

- 56) Hafez, E. S. E. & S. Jaszczak (1975): Sperm transport in the female tract of nonhuman primates. In "The Biology of Spermatozoa", (E. S. E. Hafez & C. G. Thibault, eds.), pp. 156-165, INSERM Int. Symp., Nouzily 1973, Karger, Basel.
- 57) Hamilton, W. J. & J. H. Gould (1940): The normal oestrus cycle of the ferret: the correlation of the vaginal smear and the histology of the genital tract with notes on the distribution of glycogen, the incidence of growth and the reaction to intravital staining by trypan blue. Trans. Roy. Soc. Edin., **60**: 87-109.
- 58) Handrow, R. R., S. K. Boehm, R. W. Lenz, J. A. Robinson & R. L. Aux (1984): Specific binding of glycosaminoglycan ^3H -heparine to bull, monkey and rabbit spermatozoa *in vitro*. J. Androl., **5**: 51-63.
- 59) Helm, G., C. H. Owman, E. Rosengren, N. O. Sjöberg (1982): Regional and cyclic variations in catecholamine concentrations of the human fallopian tube. Biol. Reprod., **26**: 553-558.
- 60) Herr, J. C. & E. M. Eddy (1980): Detection of mouse sperm antigens by a surface labeling and immunoprecipitation approach. Biol. Reprod., **22**: 1263-1274.
- 61) Hicks, J. J., J. M. Manauto, N. Pedron & A. Rosado (1972): Metabolic changes in human spermatozoa related to capacitation. Fertil. Steril., **23**: 172-179.
- 62) Holt, W. V. (1980): Surface-bound sialic acid on ram and bull spermatozoa: deposition during epididymal transit and stability during washing. Biol. Reprod., **23**: 847-857.
- 63) Huang, T. T. F. & R. Yanagimachi (1985): Inner acrosomal membrane of mammalian spermatozoa: its properties and possible functions in fertilization. Am. J. Anat., **174**: 249-268.
- 64) Hunter, A. G. & H. O. Nornes (1966): Sperm coating antigens and capacitation of rabbit sperm. J. Anim. Sci., **25**: 925.
- 65) Hunter, A. G. & H. O. Nornes (1969): Characterisation and isolation of a sperm-coating antigen from rabbit seminal plasma with capacity to block fertilization. J. Reprod. Fert., **20**: 419-427.
- 66) Hunter, R. H. F. (1975): Transport, migration and survival of spermatozoa in the female genital tract. In "The Biology of Spermatozoa", (E. S. E. Hafez & C. G. Thibault, eds.), pp. 145-155, INSERM Int. Symp., Nouzilly 1973, Karger, Basel.
- 67) Hunter, R. H. F. (1981): Sperm transport and reservoirs in the pig oviduct in relation to the time of ovulation. J. Reprod. Fert., **63**: 109-117.
- 68) Hunter, R. H. F. (1982): Interrelationships between spermatozoa, the female reproductive tract, and the egg investment. In "Control of Pig Reproduction", (D. J. A. Cole & G. R. Foxcroft, eds.), pp. 49-63, Butterworths, London.
- 69) Hunter, R. H. F. (1984): Towards 100% fertilisation in inseminated cows, with particular reference to the site of sperm storage. Anim. Breed. Abstr., **52**: 1-5.
- 70) Hunter, R. H. F. & R. Nichol (1983): Transport of spermatozoa in the sheep oviduct: preovulatory sequestering of cells in the caudal isthmus. J. Exp. Zool., **228**: 121-128.
- 71) Hunter, R. H. F. & I. Wilmut (1983): The rate of functional sperm transport into the oviducts of mated cows. Anim. Reprod. Sci., **5**: 167-173.
- 71) Hunter, R. H. F. & I. Wilmut (1984): Sperm transport in the cow: periovulatory redistribution of viable cells within the oviduct. Reprod. Nutr. Develop., **24**: 597-608.
- 73) Hunter, R. H. F., L. Barwise & R. King (1982): Sperm transport, storage and release in the sheep oviduct in relation to the time of ovulation. Br. Vet. J., **138**: 225-232.
- 74) Hunter, R. H. F., B. Cook & N. L. Poyser (1983): Regulation of oviduct function in pigs by local transfer of ovarian steroids and prostaglandins: a mechanism to influence sperm transport. Eur. J. Obstet. Gynec. Reprod. Biol., **14**: 225-232.
- 75) Hunter, R. H. F., R. Nichol & S. M. Crabtree (1980): Transport of spermatozoa in the ewe: timing of the establishment of a functional population in the oviduct. Reprod. Nutr. Develop., **20**: 1869-1875.
- 76) Hyne, R. V. & K. P. Edwards (1985): Influence of 2-deoxyl-D-glucose and energy substrates on guinea-pig sperm capacitation and acrosome reaction. J. Reprod. Fert., **73**: 59-69.
- 77) 入谷 明 (1972): 哺乳動物の精子 (飯田 勲編), pp. 385-402. 学窓社, 東京.
- 78) Iritani, A., Y. Tsunoda, M. Miyake & Y. Nishikawa (1975): Enhanced respiration and reduction of tetracycline binding of boar and bull spermatozoa following incubation in the

- female genital tract. Jpn. J. Zootech. Sci., **46**: 531-537.
- 79) Johnson, W. L. & A. G. Hunter (1972): Immunofluorescent evaluation of the male rabbit reproductive tract for sites of secretion and absorption of seminal antigens. Biol. Reprod., **6**: 13-22.
 - 80) Joshi, M. S. & I. M. Murray (1974): Immunological studies of the rat uterus fluid peptidase. J. Reprod. Fert., **37**: 361-365.
 - 81) Johnson, L. A., D. L. Garner, A. J. Truitt-Gilbert & A. Lessley (1983): Immunocytochemical acrosin on both acrosomal membranes and in the acrosomal matrix of porcine spermatozoa. J. Androl., **4**: 222-229.
 - 82) 影山圭三 (1973): 病理組織標本の作り方. 医学書院, 東京.
 - 83) Koehler, J. K. (1981 a): Lectins as probes of the spermatozoa surface. Arch. Androl., **6**: 197-217.
 - 84) Koehler, J. K. (1981 b): Surface alteration during the capacitation of mammalian spermatozoa. Am. J. Primatol., **1**: 131-141.
 - 85) Koehler, J. K., E. D. Nudelman & S. Hakomori (1980): A collagen-binding protein of the surface of ejaculated rabbit spermatozoa. J. Cell Biol., **86**, 529-536.
 - 86) Koyama, H. (1987): Spermiophagy by epithelial cells of the ductuli efferentes in the rat: a scanning and transmission electron microscopic study. Jpn. J. Zootech. Sci., **58**: 1067-1077.
 - 87) Langlais, J. & K. D. Roberts (1985): A molecular membrane model of sperm capacitation and the acrosome reaction of mammalian spermatozoa. Gamete Res., **12**: 183-224.
 - 88) Legault, Y., G. Bleau, A. Chapedelaine & K. D. Roberts (1980): Steroid sulfatase activity of hamster reproductive tract during the estrous cycle. Biol. Reprod., **23**: 720-725.
 - 89) Lewis, L. L. (1911): The vitality of reproductive cells. Oklahoma Agric. Exper. Sta. Bull., **96**.
 - 90) Lovell, J. E. & R. Getty (1968): Fate of semen in the uterus of the sow: histologic study of endometrium during the 27 hours after natural service. J. Vet. Res., **29**: 609-625.
 - 91) Mann, T. (1964): Metabolism of semen: fructolysis, respiration, and sperm energetics. In "Biochemistry of Semen and of the Male Reproductive Tract", pp. 265-307, Methuen, London.
 - 92) Mann, T., C. Polge & L. E. A. Rowson (1956): Participation of seminal plasma during the passage of spermatozoa in the female reproductive tract of the pig and horse. J. Endocr., **13**: 133-140.
 - 93) Martinet, L. & F. Raynaud (1975): Prolonged spermatozoan survival in the female hare uterus: explanation of superfetation. In "The Biology of Spermatozoa", (E. S. E. Hafez & C. G. Thibault, eds.), pp. 134-144, INSERM Int. Symp., Nouzilly 1973, Karger, Basel.
 - 94) Martinet, L., J. J. Legouis & B. Moret (1970): Quelques observations sur la reproduction dulièvre européen (*Lepus europaeus pallas*) en captivité. Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys., **10**: 195-202.
 - 95) Mattner, P. E. (1966): Formation and retention of the spermatozoan reservoir in the cervix of the ruminant. Nature, London, **212**: 1479-1480.
 - 96) Mattner, P. E. (1968): The distribution of spermatozoa and leucocytes in the female genital tract in goats and cattle. J. Reprod. Fert., **17**: 253-261.
 - 97) Mattner, P. E. & A. W. H. Braden (1969): Comparison of the distribution of motile spermatozoa in the ovine cervix. Aust. J. Biol. Sci., **22**: 1069-1070.
 - 98) McRorie, R. A. & W. L. Williams (1974): Biochemistry of mammalian fertilization. A. Rev. Biochem., **43**: 777-803.
 - 99) Meizel, S. & S. K. Mukerji (1975): Proacrosin from rabbit epididymal spermatozoa: partial purification and initial biochemical characterization. Biol. Reprod., **13**: 83-93.
 - 100) Meizel, S., C. W. Lui, P. K. Working & R. J. Mersny (1980): Taurine and hypotaurine: their effects on motility, capacitation and the acrosome reaction of hamster sperm *in vitro* and their presence in sperm and reproductive tract fluids of several mammals. Dev. Growth Diff., **22**: 483-494.
 - 101) Metz, C. B. (1967): Gamete surface components and their rôle in fertilization. In "Fertilization I", (C. B. Metz & A. Monroy, eds.), pp. 163-236, Academic Press, New York.
 - 102) Moore, H. D. M. & K. G. Hibbitt (1976): The binding of labelled basic proteins by boar spermatozoa. J. Reprod. Fert., **46**: 71-76.
 - 103) Morton, D. B. (1975): Acrosomal enzymes: immunochemical localization of acrosin and hyaluronidase in ram spermatozoa. J. Reprod.

- Fert., 45: 375-378.
- 104) Moyer, D. L., G. M. Kunitake & R. M. Nakamura (1965): Electron microscopic observations on phagocytosis of rabbit spermatozoa in the female genital tract. *Experimentia*, 21: 6-7.
- 105) Moyer, D. L., G. Legorreta, H. Maruta & V. Henderson (1967): Elimination of homolomicroscope study. *J. Path. Bact.*, 94: 345-350.
- 106) Mrsny, R. J. & S. Meizel (1981): Potassium ion influx and Na^+ , K^+ -ATPase activity are required for the hamster sperm acrosome reaction. *J. Cell Biol.*, 91: 77-82.
- 107) Müller, B. & C. Kirchner (1980): Purification and properties of a carbohydrate containing glycoprotein specific to rabbit genital tract. *Biol. Reprod.*, 23: 143-152.
- 108) Nicholson, R. (1965): Vitality of spermatozoa in the endocervical canal. *Fertil. Steril.*, 16: 758-764.
- 109) 岡野 彰・入谷 明・西川義正 (1977): 家兎精漿の蛋白組成と抗原性. *日畜会報*, 48: 263-266.
- 110) Oliphant, G. & B. J. Brackett (1973) Immunological assessment of surface changes of rabbit sperm undergoing capacitation. *Biol. Reprod.*, 9: 404-414.
- 111) Oliphant, G. & C. A. Singhas (1979): Iodination of rabbit sperm plasma membrane: relationship of specific proteins to epididymal function and sperm capacitation. *Biol. Reprod.*, 21: 937-944.
- 112) Oliphant, G., A. B. Reynolds & T. S. Thomas (1985): Sperm surface components involved in the control of the acrosome reaction. *Am. J. Anat.*, 174: 269-283.
- 113) 大沼秀男 (1963): 家畜精子の acrosomic system に関する研究, VI. 牛および豚の射出精子の acrosomic system の形態ならびにその保存と温度衝撃による形態的变化. *畜試研報*, 3: 105-119.
- 114) 大原睦生 (1981): 豚の雌性生殖道内における精子からの精子被覆抗原の消失. *日畜会報*, 52: 507-511.
- 115) Oevrstreet, J. W. & G. W. Cooper (1978): Sperm transport in the reproductive tract of the female rabbit: I. The rapid transit phase of transport. *Biol. Reprod.*, 19, 101-114.
- 116) Overstreet, J. W., G. W. Cooper, D. F. Katz (1978): Sperm transport in the reproductive tract of the female rabbit. II. The sustained phase of transport. *Biol. Reprod.*, 19: 115-132.
- 117) Parrish, R. F. & K. L. Polakoski (1979): Mammalian sperm proacrosin-acrosinsystem. *Int. J. Biochem.*, 10: 391-395.
- 118) Parrish, R. F., T. J. Wincek & K. L. Polakoski (1980): Glycosaminoglycan stimulation of the *in vitro* conversion of boar proacrosin into acrosin. *J. Androl.* 1: 89-95.
- 119) Penn, A., B. L. Gledhill & Z. Darzynkiewicz (1972): Modification of the gelation substrate procedure for demonstration of acrosomal proteolytic activity. *J. Histochem. Cytochem.*, 20: 499-506.
- 120) Perreault, S., L. J. D. Zaneveld & B. J. Rogers (1980): Inhibition of fertilization in the hamster by sodium aurothromalate, a hyaluronidase inhibitor. *J. Reprod. Fert.*, 60: 461-467.
- 121) Piko L. (1979): Gamete structure and sperm entry in mammals. In "Fertilization. Vol. 2", (C. B. Mets & A. Monroy, eds.), pp. 325-403, Academic Press, New York.
- 122) Polakoski, K. L., L. J. D. Zaneveld & W. L. Williams (1971): An acrosin acrosin inhibitor complex in ejaculated boar sperm. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 45: 381-386.
- 123) Potts, D. M. & P. A. Racey (1971): A light and electron microscope study of early development in the bat *Pipistrellus Pipistrellus*. *Micron*, 2: 322-348.
- 124) Propping, D., P. F. Tauber & L. J. D. Zaneveld (1978): An improved assay technique for the proteolytic activity of individual human spermatozoa. *Int. J. Fertil.*, 23: 45-50.
- 125) Quinlan, J., G. S. Mare & L. L. Roux (1933): A study of the duration of motility of spermatozoa in the different divisions of the reproductive tract of the Merino ewe. *Onderstepoort. J. Vet. Sci. Anim. Ind.*, 1: 135-145.
- 126) Racey, P. A. (1979): The prolonged storage and survival of spermatozoa in Chiroptera. *J. Reprod. Fert.*, 56: 391-402.
- 127) Racey, P. A. & D. M. Potts (1970): Relationship between stored spermatozoa and the uterine epithelium in the pipistrelle bat (*Pipistrellus pipistrellus*). *J. Reprod. Fert.*, 22: 57-63.
- 128) Racey, P. A., F. Suzuki & L. Medway (1975): The relationship between stored spermatozoa and the oviductal epithelium in bats of the genus *Tylonycteris*. In "The Biology of

- Spermatozoa", (E. S. E. Hafez & C. G. Thibault, eds.), pp. 132-133, INSERM Int. Symp., Nouzilly 1973, Karger, Basel.
- 129) Rahi, H. & P. N. Srivastava (1983): Hormonal regulation of lysosomal hydrolases in the reproductive tract of the rabbit. *J. Reprod. Fert.*, **67**: 447-455.
 - 130) Rahi, H. & P. N. Srivastava (1984): Lysosomal hydrolases in reproductive organs during estrous cycle of the hamster. *Gamete Res.*, **10**: 57-66.
 - 131) Reid, B. L. (1965): Fate of uterine spermatozoa in the mouse post-coitum. *Aust. J. Zool.*, **13**: 189-199.
 - 132) Reyes, A., G. Oliphant & B. G. Brackett (1975): Partial purification and identification of a reversible decapacitation factor from rabbit seminal plasma. *Fertil. Steril.* **26**: 148-157.
 - 133) Rigby, J. P. (1964): The fate of spermatozoa in the genital tract of the sow following artificial insemination. *Proc. 5th Int. Congr. Anim. Reprod.*, **4**: 424-428.
 - 134) Russell, L. D., B. Kramper, W. Hunt & R. N. Peterson (1984): Selective solubilization of major boar sperm plasma membrane (PM) polypeptides (PS) by detergents and buffer of various ionic strength. *Biol. Reprod.*, **30** (Suppl. 1), 111 a.
 - 135) Seitz, H. M., G. Rocha, B. G. Brackett & L. Mastroianni (1970): Influence of the oviduct on sperm capacitation in the rabbit. *Fertil. Steril.*, **21**: 325-328.
 - 136) Shinohara, H., R. Yanagimachi & P. N. Srivastava (1985): Enhancement of the acrosome reaction of hamster spermatozoa by proteolytic enzymes, kallikrein, trypsin and chymotrypsin. *Gamete Res.*, **11**: 19-28.
 - 137) Shulman, S. (1975): Sperm antibodies and their relationship to infertility. In "Reproduction and Antibody Response", (S. Shulman, ed.), pp. 37-92, CRC Press, Cleveland.
 - 138) Sinowatz, F. & A. E. Friess (1983): Uterine glands of the pig during pregnancy, an ultrastructural and cytochemical study. *Anat. Embryol.*, **166**: 121-134.
 - 139) Srivastava, P. N. & K. G. Gould (1973): Inhibition of the fertilizing capacity of rabbit spermatozoa by sialoproteins. *Contraception*, **7**: 65-73.
 - 140) Stambaugh, R. & J. Buckley (1969): Identification and subcellular localization of the enzymes effecting penetration of the zona pellucida by rabbit spermatozoa. *J. Reprod. Fert.*, **19**: 423-432.
 - 141) Stein, D. M. & L. R. Fraser (1984): Cyclic nucleotide metabolism in mouse epididymal spermatozoa during capacitation *in vitro*. *Gamete Res.*, **10**: 283-299.
 - 142) Stein, D. M., L. R. Fraser & N. J. Monks (1986): Adenosine and Gpp (NH)p modulate mouse sperm adenylate cyclase. *Gamete Res.* **13**: 151-158.
 - 143) Stevens, K. R., H. D. Hafs & K. T. Kirton (1964): Volume, pH and protein content of fluids from ligated uteri of estrous rabbits. *J. Reprod. Fert.*, **7**: 331-335.
 - 144) 菅原七郎 (1982): 雌, 雌性生殖道内の精子, とくに精子の射出までの成熟および雌性生殖道内の上走と成熟. 家畜人工授精, **92**: 1-15.
 - 145) Suzuki, F. (1981): Changes in intramembranous particle distribution in epididymal spermatozoa of the boar. *Anat. Rec.*, **199**: 361-376.
 - 146) Suzuki, H. & Y. Tsutsumi (1981): Intraluminal pressure changes in the oviduct, uterus, and cervix of the mated rabbit. *Biol. Reprod.*, **24**: 723-733.
 - 147) Thibault, C. (1973): Sperm transport and storage in vertebrates. *J. Reprod. Fert. Suppl.*, **18**: 39-53.
 - 148) Thibault, C. & S. Winterberger-Torres (1967): Oxytocin and sperm transport in the ewe. *Int. J. Fertil.*, **12**: 410-415.
 - 149) Thibault, C., M. Gread & Y. Heyman (1975): Transport and survival of spermatozoa in cattle. In "The Biology of Spermatozoa", (E. S. E. Hafez & C. G. Thibault, eds.), pp. 156-165, INSERM Int. Symp., Nouzilly 1973, Karger, Basel.
 - 150) Towbin, H., T. Staehelin & J. Gordon (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Biochemistry*, **76**: 4350-4354.
 - 151) Tyndale-Biscoe, C. H. & J. C. Rodger (1978): Differential transport of spermatozoa into the two sides of the genital tract of a monovular marsupial, the tammar wallaby (*Macropus eugenii*). *J. Reprod. Fert.*, **52**, 37-43.
 - 152) Ullmann, S. L. (1976): Anomalous litters in

- hybrid mice and the retention of spermatozoa in the female tract. *J. Reprod. Fert.*, **47**: 13-18.
- 153) Vacquire, V. D. (1975): The isolation of intact cortical granules from seaurchin eggs: calcium ions trigger granule discharge. *Dev. Biol.*, **43**: 62-74.
 - 154) Vaidya, R. A., J. M. Bedford, R. H. Glass & J. McL. Morris (1969): Evaluation of the removal of tetracycline fluorescence from spermatozoa as a test for capacitation in the rabbit. *J. Reprod. Fert.*, **19**: 483-489.
 - 155) Vierula, M. & H. Rajaniemi (1980): Radioiodination of surface proteins of bull spermatozoa and their characterization by sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Reprod. Fert.*, **58**: 483-489.
 - 156) Volglmayr, J. K. & F. R. Sawyer (1986): Surface transformation of ram spermatozoa in uterus, oviduct and cauda epididymal fluids *in vitro*. *J. Reprod. Fert.*, **78**: 315-325.
 - 157) Waibel, R., L. C. Ginsberg & G. Ficsor (1984): Cytochemical detection of hyaluronidase activity in single human and mouse sperm by an improved substrate-film technique. *Histochem. Cytochem.*, **32**: 63-66.
 - 158) Wardrip, N. J., J. L. Hedrick & T. Berger (1985): Comparison of pig zona pellucida from oocytes, eggs and zygotes. *Fed. Proc.*, **44**: 1778a.
 - 159) Weil, A. J. (1960): Immunological differentiation of epididymal and seminal spermatozoa of the rabbit. *Science*, **131**, 1040-1041.
 - 160) Weil, A. J. & J. M. Rodenburg (1962): The seminal vesicle as the source of the spermatozoa coating antigen of seminal plasma. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **109**: 567-570.
 - 161) Weinman, D. E. & W. L. Williams (1964): Mechanism of capacitation of rabbit spermatozoa. *Nature, London*, **203**: 423-424.
 - 162) Wilborn, W. H. & C. E. Flowers (1979): Histo-enzymology of human endometrium during the proliferative and secretory phases. In "The Biology of the Fluids of the Female Genital Tract", (F. K. Beller & C. F. B. Schumacher, eds.), pp. 73-87, Elsevier, North Holland.
 - 163) Williams, W. L., T. O. Abney, H. N. Chernoff, W. R. Dukelow & M. C. Pinsker (1967): Biochemistry and physiology of decapacitation factor. *J. Reprod. Fert. Suppl.*, **2**: 11-23.
 - 164) Wincek, T. J., R. F. Parrish & K. L. Polakoski (1979): Fertilization: a uterine glycosaminoglycan stimulates the conversion of sperm proacrosin to acrosin. *Science*, **203**, 553-554.
 - 165) Yanagimachi, R. (1981): Mechanisms of fertilization in mammals. In "Fertilization and Embryonic Development *In Vitro*", (L. Mastroianni & J. D. Biggers, eds.), pp. 81-182. Plenum Press, New York.
 - 166) Yanagimachi, R. (1988): Mammalian fertilization. In "The Physiology of Reproduction", (E. Knobil & J. Neill, eds.), pp. 135-185. Raven Press, New York.
 - 167) 吉田重雄 (1972): 哺乳動物の精子。(飯田 勲編), pp. 293-315. 学窓社, 東京.
 - 168) Zahler, W. L. & G. A. Doak (1975): Isolation of the outer acrosomal membrane from bull sperm. *Biochem. Biophys. Acta.*, **406**, 479-488.
 - 169) Zamboni, L. (1968): Electron microscope studies of mammalian fertilization. A new approach to the problem. In "Proceedings of the 4th European Regional Conference on Electron Microscopy", (S. D. Rome, ed.), pp. 313-316, Tipografia Poliglotta Vaticana.
 - 170) Zamboni, L. (1971): Interaction between gametes. In "Fine Morphology of Mammalian Fertilization", (L. Zamboni, ed.), pp. 120-212, Harper & Row, New York.
 - 171) Zaneveld, L. J. D. & W. L. Williams (1970): A sperm enzyme that disperses the corona radiata and its inhibition by decapacitation factor. *Biol. Reprod.*, **2**: 363-368.
 - 172) Zaneveld, L. J. D., R. T. Robertson, M. Kessler & W. L. Williams (1971): Inhibition of fertilization *in vivo* by pancreatic and seminal plasma trypsin inhibitors. *J. Reprod. Fert.*, **25**: 387-392.
 - 173) Zaneveld, L. J. D., P. N. Srivastava & W. L. Williams (1969): Relationship of a trypsin-like enzyme in rabbit spermatozoa to capacitation. *J. Reprod. Fert.*, **20**: 337-339.

Summary

To determine the proper mating time, it is important to clarify the sperm movement in the female reproductive tract, and this will result in an improvement in fertility. In general, the principal object is put on the elucidation of the transport and maturity of the spermatozoa in the female reproductive tract. The elucidation of various phenomena of the storage of the spermatozoa in the female reproductive tract is not yet known sufficiently. However, the sperm storage in the female reproductive tract affects the survival time of the spermatozoa, and their release from the storage sites will have an important meaning when esturs is prolonged or mating is early.

There is a very little information on the physiological relationships between spermatozoa and uterine gland which occupies the majority of the female reproductive tract. In the present study, the sperm penetration into the uterine gland and the significance of sperm penetration were investigated.

1) Studies which have examined the sperm penetration into the rabbit uterine gland are not yet found in detail. There is also very little information concerning sperm penetration into the uterine gland in the sow and cow. Therefore, a study on sperm penetration into the uterine gland of rabbits, sows and cows after mating were carried out with a light microscope and a scanning electron microscope (SEM). In the rabbit, spermatozoa appeared in the uterine gland 2 hours after mating (0-2064/100 serial sections of $7\mu\text{m}$ thickness), especially in the lower part of the uterine horn. As time progressed, spermatozoa advanced to the upper part of the uterine horn and became distributed throughout the whole uterine horn within 4 hours after mating. However, the number of spermatozoa acutely decreased at 48 hours after mating, and they were unobservable at 96 hours. In sows, spermatozoa were found in only 2 sows which were killed at 7 hours and 26 $1/6$ hours after mating (84-3556/100 serial sections of $7\mu\text{m}$ thickness). In case of the other 4 sows, no spermatozoa were found in the uterine gland during autopsies performed 42 $5/6$ to 49 $1/6$ hours after mating. In cows, spermatozoa were observed in the uterine gland at 24 hours after the insemination with frozen-thawed semen (37-417/100 serial sections of $7\mu\text{m}$ thickness), both in preovulatory and ovulated cows. Most spermatozoa located in the uterine glands had their heads directed toward the distal end of the gland in these 3 species, though some glandular spermatozoa clearly directed their head to the glandular opening. Many uterine spermatozoa were closely associated with leukocytes, but the numbers of phagocytized glandular spermatozoa were very few in each species. Such studies which concretely show the number of glandular spermatozoa are very few. Moreover, the present study is the first to clarify the direction and phagocytized rates of the glandular spermatozoa.

SEM study of the uterine mucosal surface in rabbits and sows clearly shows the entry of the sperm heads into the glandular openings and the protrusion of the sperm tails from the openings into the uterine lumen.

2) It is suggested that the motility of the spermatozoa may be main factor in the sperm penetration into the uterine gland. This experiment was designed to examine the effect of sperm motility on the sperm penetration into the uterine gland. Semen freshly collected with an artificial vagina from rabbits and cows or the dead rabbit spermatozoa which had been killed by cold shock were deposited into the uterus via the cervix. As a result, the number of spermatozoa observed in the uterine gland of 100 serial sections following the deposition of freshly ejaculated rabbit and bovine semen into the uterine horn were 233-517,320 and 233-51,730 respectively.

However, when the dead spermatozoa were deposited, only 0-98 spermatozoa were observed in the uterine gland. After the dead spermatozoa were deposited into the uterus, the uterus was ligated near the uterotubal junction and uterocervical junction. The observed spermatozoa in the uterine gland were slightly increased, and the range was 0-568. In the uterine gland, most of these dead spermatozoa were phagocytized by the macrophage (42.0-100%). Therefore, sperm penetration into the uterine gland was affected mainly by the sperm motility.

3) It was thought that the sperm's disappearance from the uterine gland was related with the estrus or ovulation of the rabbit. Thus, ejaculated spermatozoa were deposited into the rabbits uterine horn and hCG or indomethacin was injected. The spermatozoa disappeared from the uterine gland 2 days after the injection of hCG. However, if ejaculated spermatozoa were deposited in the uterine horn when hCG was not injected or when indomethacin was injected the uterine gland spermatozoa were observed until 5 days. On the other hand, the uterine cavity spermatozoa disappeared at 2 days after hCG or indomethacin was injected. It is necessary to define the possibility of the sperm release from the uterine gland to the uterine cavity. The times of hCG injection varied from 1 to 5 days after the insemination and an autopsy was performed 24 hours after the hCG injection. Spermatozoa were observed in the uterine gland until hCG was injected at 5 days after the insemination and motile spermatozoa (19%) were recovered from the uterine horn 4 days after insemination. The uterine cavity spermatozoa were observed when hCG was injected 4 days after the insemination and this was not observed in the previous experiment. Therefore, it was suggested that spermatozoa were released from the uterine gland to the uterine cavity by the effect of hCG injection. When 20-40% of the does were injected with hCG at 1 to 4 days after the insemination, 1-8 eggs which possessed the secondary polar body were recovered from the oviducts. It is difficult to confirm whether these eggs were fertilized with the spermatozoa which were released from the uterine gland to the uterine cavity and transported to the upper region of the oviducts. However, the possibility of fertilization was not neglected completely.

4) It was clarified that the sperm penetration into the uterine gland was mainly by the sperm motility. Therefore, the relationships between sperm penetration into the uterine gland and the distribution of polysaccharides, acid mucopolysaccharides, or lipid in the lumina of uterine glands were observed. As a result, the sperm penetration into the uterine gland is supposed to be the taxis to the polysaccharide of uterine gland secretions.

5) None of the reports are available which examined the ability of fertilization of the sperm in the uterine gland. Therefore, sperm coating antigens (SCA) were observed using immunofluorescence techniques to confirm that the spermatozoa in the uterine gland possessed the ability of fertilization within a long period. It was observed that 47.9% of the spermatozoa in the uterine glands lost SCA 12 hours after mating. However, spermatozoa recovered from the rabbit's uterus after 12 hours showed a higher SCA loss (81.3%) than the uterine gland spermatozoa. This result shows that the spermatozoa reserved in the uterine gland had the ability of fertilization.

6) Sperm coating proteins of the rabbit seminal plasma which relate to SCA were investigated using sodium dodecylsulfate-polyacrylamide slab gel electrophoresis and gel chromatography (Sephadex G-75 SF). The electrophoresis of the seminal plasma showed that 6 major bands and antiserum were produced against these purified 6 major bands and antiserum were produced against these purified 6 major proteins. The immunofluorescence reaction of the ejaculated rabbit spermatozoa was the most intensive when the antiserum produced from a protein of 14,000 molecular weight was used. This protein was presented in the third fraction (molecular weight, 35,000)

when the rabbit seminal plasma was subjected to gel chromatography on Sephadex G-75 SF. This protein was found attached to the sperm during ejaculation and detached in the uterus.

7) The effects of the uterine environment on the hylauronidase and acrosin activities of the spermatozoa were examined using a histochemical method in the rabbit. The halo diameters increased with time in both enzymes, and the largest diameter was obtained at 8-10 hours after mating. This result suggests that the uterus in the estrous rabbit affects the sperm enzyme activities, including hyaluronidase and acrosin. It was thought that the increase of enzyme activity was probably correlated with SCA removal in the uterus, since the time of enzyme increased with the same decrease of seminal plasma components.

The result of this research is the first attempt to show the rabbit spermatozoa penetration into the uterine gland and that spermatozoa possess the fertilizing ability for a long period in the uterine gland.